ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. I No 2

1 9 5 2

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA są kwartalnym organem Sekcji Mikrobiologii Ogólnej, Rolniczej i Przemysłowej P. T. M.

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej oraz referaty przeglądowe nigdzie dotychczas nie publikowane.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm, należy przysyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin, ul. Stalingradzka 85.

Aż do odwołania obowiązuje w zasadzie stosowanie się do pisowni wg Jodłowskiego i Taszyckiego, wyd. 2, r. 1951.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, oraz angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski, niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie i rosyjskie lub polskie i angielskie (francuskie, niemieckie). Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł (w języku publikacji oraz streszczenia), nazwisko i inicjały autora(-ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenia obcojęzyczne (nie dłuższe niż 15% tekstu).

Prace należy ujmować treściwie; wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisywać krótko; tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze i istotne wyniki. Rysunki i wykresy należy sporządzać w 2-krotnym powiększeniu, tuszem na bristolu bez połysku — każdy na oddzielnej kartce zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołów-

W dniach 28—30 września odbędzie się w Łodzi XII Zjazd Mikrobiologów Polskich.

Główna tematyka Zjazdu przewiduje następujące referaty:

1. Biocenozy
2. Metabolizm drobnoustrojów
3. Biologia wirusów.

Zjazd będzie obradował w 2 sekcjach: 1) Mikrobiologii lekarskiej i weterynaryjnej i 2) Mikrobiologii ogólnej, przemysłowej i rolniczej.

Doniesienia z prac oryginalnych zgłaszać należy na ręce sekretarza Komitetu Organizacyjnego Zjazdu dr K. Kotełko. (Adres: Zakład Bakteriologii U. Ł., Łódź, ul. Nowotki 18) do dnia 15 lipca wraz ze streszczeniem nieprzekraczającym 25 linii maszynopisu.

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
(Prof. dr B. Zabłocki)

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. I No 2

ERRATA

do No I. Str. 18, wykres 7. Napis na krzywej 3 od góry winien opiewać E+S+1 ml

do No II. Str. 140, wiersz 19 od dołu zamiast „szczepu T" winno być „szczepu Th".

1952
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

Jadwiga Ziemięcka, członek koresp. P.A.N. (redaktor) — Lublin,
Władysław Kunicki-Goldfinger (sekretarz naukowy) — Lublin,
Kazimierz Bassalik, członek tytularny P. A. N. — Warszawa,
Jadwiga Jakubowska — Łódź, —:— Adolf Joszt — Gliwice,
Eugeniusz Pijanowski, członek koresp. P. A. N. — Warszawa

SEKRETARZ TECHNICZNY
Kazimierz Dygdała — Lublin

*

Adres redakcji: Lublin, ul. Stalingradzka 85

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1952

Nakład 1 000	*Zamówienie 1200*
Arkuszy wyd. 7 Druk. 5 1/4	*Druk ukończono 30.VI.52*
Papier druk. sat. V, 70 g, 70×100	*A—3—11186*

DRUKARNIA PRASOWA — LUBLIN, BUCZKA 12

W dniu 18 kwietnia 1952 r. cały Naród uroczyście obchodził 60-tą rocznicę urodzin Pierwszego Obywatela Rzeczypospolitej Polskiej Prezydenta Bolesława Bieruta.

W Polsce Ludowej, pod Jego baczną i troskliwą opieką nauka znalazła korzystne warunki rozwoju również na odcinku nauki reprezentowanej przez nasze pismo. W porównaniu z okresem przedwojennym ilość katedr i zakładów uczelnianych zajmujących się bezpośrednio lub pośrednio mikrobiologią rolniczą i techniczną uległa co najmniej podwojeniu, a obok katedr lub nawet całych wydziałów poświęconych w znacznym stopniu studiom w zakresie mikrobiologii technicznej czynne są powstałe w ostatnich latach poważne ośrodki samodzielnych badań mikrobiologicznych w ramach Centralnego Instytutu Rolniczego i Głównego Instytutu Przemysłu Rolnego i Spożywczego.

Jesteśmy przekonani, że polska nauka mikrobiologii w nawiązaniu do bogatych tradycji i wielkich osiągnięć postępowej nauki radzieckiej nie zawiedzie pokładanych w niej nadziei i przyczyni się istotnie do pogłębienia wiedzy o procesach mikrobiologicznych w rolnictwie i przemyśle oraz do świadomego kierowania tymi procesami.

Wierzymy, że przez pogłębienie pracy badawczej, przez kształcenie młodych kadr naukowych, przez popularyzację wiedzy pomożemy narodowi „...w szybkim zlikwidowaniu ponurej spuścizny zacofania w produkcji, w technice, w rozwoju jego sił wytwórczych, jak również w podniesieniu ogólnego poziomu jego kultury i warunków bytu".

Niech nasza praca nad realizacją tych celów będzie dowodem czci i przywiązania do Obywatela Prezydenta, do Polski Ludowej.

Acta Microbiologica Polonica, Vol. 1, No 2.

T. W. Szczepkowski i B. Skarżyński

BIOCHEMIA SAMOŻYWNYCH BAKTERII SIARKOWYCH, CZ. I. UKŁAD CYTOCHROMOWY I HEMOPROTEIDY *THIOBACILLUS THIOPARUS* I *THIOBACILLUS THIOOXYDANS*

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Krakowie

Wpłynęło dn. 9.II.1952.

Przemiana materii chemosyntetyzujących, samożywnych drobnoustrojów jest dziedziną dotychczas bardzo mało zbadaną, a przecież kryjącą w sobie bogactwo problemów mających doniosłe znaczenie nie tylko dla nauki o drobnoustrojach, ale dla biologii w ogóle. Bez względu na to, jak będziemy się zapatrywać na ten typ ustrojów, czy będziemy w nich widzieć ewolucyjnie najstarsze uorganizowane twory tak, jak to czyniono dawniej, czy też będziemy uważać je za najwyższy szczebel rozwoju jednokomórkowców, jak to czynią Oparin (1941), Sym (1948) i Szaposznikow (1951), w każdym wypadku będziemy mieli do czynienia z organizacją biologiczną cechującą się bardzo swoistym metabolizmem. Już sam fakt, że u tych drobnoustrojów obserwujemy przyswajanie CO_2 bez udziału energii świetlnej, lecz dzięki pewnym energiodajnym procesom chemicznym, pozwala przypuszczać, że badanie przemiany materii tych organizmów rzuci wiele światła na problem przyswajania dwutlenku węgla w całej przyrodzie ożywionej.

Wśród chemosyntetyzujących samożywnych bakterii szczególnie interesujące są niektóre bakterie siarkowe, czerpiące energię dla przyswajania CO_2 z utlenienia siarki, siarkowodoru lub tiosiarczanu na siarkę lub kwas siarkowy. Drobnoustroje te nie tylko są obdarzone zdolnością budowania składników swej komórki wyłącznie z połączeń nieorganicznych, lecz nadto pozbawione są całkowicie lub w znacznym stopniu zdolności wykorzystywania związków organicznych. Co więcej, znaczniejsze stężenia substancji organicznych są dla rozwoju tych bakterii szkodliwe.

Z wody źródeł mineralnych w Swoszowicach zawierającej 51—68 mg/l siarkowodoru w źródle „Głównym" (Badania własne w r. 1951, nie publikowane) wyodrębniliśmy dwa rodzaje bakterii siarkowych, które zidentyfikowaliśmy jako *Thiobacillus thioparus* (Natanson 1902; Beijerinck 1904) i *Thiobacillus thiooxydans* (Mac Lean 1918; Lipman, Waksman i Joffe 1921; Waksman i Joffe 1922). *Th. thioparus* utlenia siarkowodór i tiosiarczan na siarkę rozwijając się w środowisku słabo zasadowym. *Th. thiooxydans* utlenia siarkę i tio-

siarczan do H_2SO_4 rozwijając się najlepiej w środowisku kwaśnym, znosząc bez szkody dla swej aktywności biologicznej nawet stężenia jonów wodorowych odpowiadające pH około 1,0. Opis przebiegu tych reakcji utleniania znajdujemy w kilku pracach (Waksman i Starkey 1922; Starkey 1925; Starkey 1934; Starkey 1935). Z wymienionych prac wynika, że *Th. thiooxydans* utlenia siarkę w myśl równania:

$$S+3/2O_2+H_2O=H_2SO_4+131{,}800 \text{ kal},$$

$$-\Delta F_{298} = 118{,}500 \text{ kal}.$$

oraz tiosiarczan według wzoru:

$$Na_2S_2O_3+2O_2+H_2O=Na_2SO_4+H_2SO_4+211{,}100 \text{ kal}.$$

Th. thioparus utlenia tiosiarczan w myśl równania:

$$5Na_2S_2O_3+H_2O+4\,O_2=5Na_2SO_4+H_2SO_4+4S+500{,}300 \text{ kal}.$$

oraz siarkowodór:

$$H_2S+1/2\,O_2=H_2O+S+32{,}500 \text{ kal}.$$

$$-\Delta F_{298} = 41{,}500 \text{ kal}.$$

Oba drobnoustroje rozwijają się niezależnie od dostępu światła i wymagają dla swego rozwoju obecności tlenu.

Metabolizm *Th. thiooxydans* badany był przez kilku badaczy amerykańskich (Umbreit, Vogel, Vogler 1942; Vogler, Le Page, Umbreit 1942; Vogler 1942a i 1942b; Le Page 1942; Le Page, Umbreit — 1943a i 1943 b). Wynikiem tych badań było stwierdzenie faktu, że w drobnoustrojach tych wytwarzane są pewne metabolity, identyczne z tymi, które wytwarzane są w komórkach bakterii cudzożywnych i w ustrojach wielokomórkowych. Dotyczy to szczególnie organicznych połączeń fosforu, takich jak kwas adenozyno-trójfosforowy i kwas glicerolofosforowy oraz estry glikozy i fruktozy z kwasem fosforowym. Należy więc wnioskować, że przynajmniej niektóre procesy przemiany materii przebiegają w tych drobnoustrojach według tego samego schematu, co w komórkach organizmów cudzożywnych.

Dostęp tlenu jest niezbędny dla prawidłowego rozwoju obu gatunków bakterii siarkowych i w jego nieobecności utlenianie siarki lub jej połączeń ustaje. Nie wiadomo było jednak dotychczas, czy procesy utleniania w komórkach samożywnych bakterii siarkowych oparte są na wykorzystaniu układu cytochromowego, tak jak u wszystkich bakterii tlenowych, czy też przebiegają przy udziale innych układów enzymatycznych. Hamujące działanie cyjanków oraz azydków na procesy utleniania związków siarki przez omawiane wyżej drobnoustroje nasuwało przypuszczenie, że układ cytochromowy decyduje o przebiegu utleniania w tych ustrojach.

Badania nasze miały na celu wyjaśnienie tego zagadnienia.

METODYKA

1) Przygotowanie czystych hodowli

Dla *Th. thioparus:*

Kilka mililitrów wody ze źródeł swoszowickich dodano do pożywki Beijerincka o następującym składzie: $Na_2S_2O_3 . 5H_2O$ — 2,5 g, $NaHCO_3$ — 0,5 g, K_2HPO_4—0,1 g,

NH_4Cl — 0,05 g, $MgCl_2 . 6H_2O$ — 0,05 g, woda dest. — 500 g. Ponieważ z badań naszych wynikało, że dodatek żelaza wpływa korzystnie na wzrost tych bakterii, do dalszych pożywek dodawaliśmy 250 μ g $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ na 500 g wody.

Dla *Th. thiooxydans* przygotowano pożywkę wg Waksmana (1922): $(NH_4)_2SO_4$ — 0,2 g, $MgSO_4 . 7H_2O$ — 0,5 g, KH_2PO_4—3 g, $CaCl_2$—0,25 g, siarka — 10 g, $FeSO_4$ — 0,01 g, woda dest. — 1000 g. W dalszych hodowlach zmodyfikowano tę pożywkę używając NH_4Cl i $MgCl_2$ zamiast $(NH_4)_2SO_4$ i $MgSO_4$ oraz *sulfur resublimatum* Mercka w ilości 2 g zamiast 10 g.

Po dwóch dniach rozwijającą się w tych warunkach hodowlę *Th. thioparus* przeszczepialiśmy na nową pożywkę; powtarzaliśmy ten zabieg kilkakrotnie, po czym przeszczepialiśmy ją na agar zawierający wyżej wymienione składniki. Podobnie postępowaliśmy z *Th. thiooxydans*, ze względu jednak na jego powolniejszy wzrost przeszczepień dokonywaliśmy co 4 dni. Agar pokrywał się koloniami, których wygląd zgadzał się z opisem podanym w literaturze. Z agaru przenosiliśmy kolonie ponownie na odpowiednią pożywkę płynną.

Czystość hodowli kontrolowano częstym badaniem mikroskopowym. Do barwienia używaliśmy błękitu metylenowego Loefflera lub fuksyny zasadowej.

Hodowle odsączano na sączku porcelanowym i poddawano wirowaniu w celu oddzielenia ich od siarki. Hodowle *Th. thioparus* odsączano po zużyciu 90% tiosiarczanu pożywki, hodowle *Th. thiooxydans* zaś po upływie 7 dni.

Dla wykrywania enzymów rozcierano w moździerzu w ciągu 10 minut zebrany wzrost bakterii wraz z pyłem szklanym. Pył szklany otrzymano przez zmielenie szkła pyreksowego w młynie kulkowym.

2) Wykrywanie cytochromów

Zawiesina bakterii badana była przy użyciu spektrometru rewersyjnego Hartridge'a. Badanie przeprowadzaliśmy zarówno w zwykłej temperaturze, jak i w temperaturze ciekłego powietrza.

3) Oznaczanie ilościowe katalazy

Oznaczanie katalazy przeprowadzaliśmy wg Eulera (1927). Metoda ta polega na mierzeniu stałej k_s szybkości rozkładu H_2O_2 w temperaturze 0° przy przeliczeniu na 1 g masy. Masę bakterii obliczaliśmy na podstawie ilości azotu oznaczonego metodą mikrokjeldahla przyjmując wg Le Page'a i Umbreita (1943), że ilość azotu odpowiada 10% suchej masy komórek bakteryjnych.

4) Wykrywanie peroksydazy

Stosowaliśmy tu metodę jakościową opartą na utlenianiu benzydyny w obecności nadtlenku wodoru.

5) Oznaczanie oksydazy cytochromowej

Stosowaliśmy metody opracowane przez Stotza, Sidwella i Hognessa (1938) oraz Slatera (1949). Metoda Stotza polega na manometrycznym oznaczaniu zużycia tlenu przez miazgę komórkową w obecności p-fenilenodwuaminy, cysteiny lub kwasu askorbinowego wobec nadmiaru cytochromu *c* w odniesieniu do ślepej próby zawierającej zagotowaną zawiesinę. Metoda Slatera polega na stosowaniu wzrastających stężeń cytochromu *c*. Cytochrom *c* przygotowaliśmy z mięśnia sercowego konia wg Keilina i Hartree (1945). Dializowany roztwór cytochromu *c* sączono i oznaczono w nim stężenie cytochromu za pomocą spektrofotometru König — Martensa. Szczelinę wejściową ustawiano na 0,7 mm, a wyjściową na 5 mm. W jednym naczyńku umieszczano: wody — 6 ml, 0,1 M

buforu fosforanowego o pH 7,4—3 ml, 0,01 M $K_3Fe(CN)_6$ — 0,3 ml, 0,5% NaCl — 0,6 ml. W drugim naczyńku zamiast roztworu NaCl umieszczano badany roztwór cytochromu. Stężenie cytochromu c — C obliczano dzieląc ekstynkcję E przez współczynnik k. Dla długości fali = 5500 Å współczynnik k dla postaci utlenionej = $0,9 \cdot 10^{-7}$, a dla postaci zredukowanej $k = 2,81 \cdot 10^{-7}$. W podanych bowiem wyżej warunkach można stosować wartości ekstynkcji dla cytochromu c w postaci utlenionej i zredukowanej podane przez Theorella (1936) i Pottera (1941).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1) Wpływ cyjanków i azydków na wzrost

Tablica I

Wpływ cyjanków i azydków na szybkość wzrostu *Th. thioparus*
Влияние цианов и азидов на быстроту роста культуры *Th. thioparus*
Effect of cyanide and azide on the rate of growth of *Th. thioparus*

molarne stężenie KCN	0	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
% zużytego $Na_2S_2O_3$ po 48 godz.	94,5[1]	0	0	0	0
molarne stężenie NaN_3	0	10^{-2}	10^{-3}		
% zużytego $Na_2S_2O_3$ po 48 godz.	94,5	0	20		

Przyrost hodowli określano na podstawie zużycia tiosiarczanu w pożywce, przy czym ilość tiosiarczanu oznaczano jodometrycznie. Wyniki podaje tabl. I.

Tablica II

Wpływ cyjanków i azydków na szybkość wzrostu *Th. thiooxydans*
Влияние цианов и азидов на быстроту роста культуры *Th. thiooxydans*
Effect of cyanide and azide on the rate of growth of *Th. thiooxydans*

Stężenie KCN	0 M	10^{-2} M	10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-5} M
utworzony H_2SO_4 w g/l	0,477	0	0	0	0,215
stężenie NaN_3	0 M	10^{-2} M	10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-5} M
utworzony H_2SO_4 w g/l	0,477	0	0	0	0,319

Przyrost hodowli oceniano na podstawie ilości utworzonego kwasu siarkowego, który oznaczano za pomocą miareczkowania n/100 NaOH po 110 godzinach od zaszczepienia. Wyniki podaje tabl. II.

Jak wynika z powyższych danych, nawet niskie stężenia cyjanku i azydku hamują utlenianie tiosiarczanu i siarki. W tych warunkach nie stwierdzono też za pomocą mikroskopowania rozwoju drobnoustrojów.

2) Wykazywanie obecności cytochromów

a) *Thiobacillus thioparus*

Zawiesina bakterii zadana dwutioninem sodowym ($Na_2S_2O_4$) wykazuje obecność dwóch smug absorbcyjnych: jednej, silniejszej o maksimum przy 552 mμ i drugiej, słabszej, przy 526 mμ. Smugi te odpowiadają położeniom smug α i β cytochromu c przesuniętych nieco ku czerwieni, smugi bowiem cytochromu c z mięśnia sercowego konia wykazują położenie 550 i 521 mμ. Wykorzystując efekt podany przez Keilina i Hartree (1949), polegający na wybitnym wzmożeniu intensywności smug absorbcyjnych w temperaturze ciekłego powietrza, zamrażaliśmy zawiesinę bakterii wstawiając próbówkę z zawiesiną do naczynia Dewara z ciekłym powietrzem i obserwowaliśmy następnie smugi pochłonne. W tych warunkach wystąpiły intensywne smugi absorbcyjne w położeniu 551 i 520 mμ. Analogicznie, położenie smug cytochromu c z mięśnia sercowego konia w temperaturze ciekłego powietrza: 547 mμ i 515 mμ. Obserwujemy więc w tym wypadku, zgodnie z Keilinem i Hartree, wybitne wzmożenie intensywności smug absorbcyjnych oraz przesunięcie ich ku fiołkowej części widma. Nie dostrzegaliśmy natomiast pojawienia się żadnej nowej smugi absorbcyjnej, która odpowiadałaby opisywanej przez Keilina smudze *E*. Powyższe obserwacje wskazują na to, że w komórkach *Th. thioparus* znajduje się tylko jeden cytochrom i że jest to cytochrom *c*. Przemawia za tym jeszcze fakt, że opisane wyżej smugi pozostają po krótkotrwałym zagotowaniu, gdy tymczasem smugi innych cytochromów powinny zniknąć. Przeciw temu, że mogą one należeć do cytochromu *b*, przemawia to, że po dodaniu uretanu i bursztynianu znikają podczas wstrząsania z powietrzem. Powyżej opisane smugi, które przypisujemy cytochromowi *c*, pojawiają się, jeżeli świeżą zawiesinę pozbawić dostępu powietrza, a znikają po wstrząsaniu z nim; pojawiają się również po dodaniu cyjanku, siarkowodoru i azydku nawet w obecności powietrza. Zawiesina bakterii po dodanu dwutioninu sodowego i pirydyny nie wykazuje pojawienia się nowych smug i przesunięcia istniejących. Badana w tych warunkach zawiesina po krótkim czasie ciemnieje.

Th. thiooxydans badany w ten sam sposób co *Th. thioparus* nie wykazuje żadnych smug pochłonnych ani w temperaturze pokojowej, ani

w temperaturze ciekłego powietrza. Po dodaniu zaś dwutioninu sodowego i pirydyny wykazuje smugę pochłonną przy 5561 Å. Świadczy to o obecności u *Th. thiooxydans* tzw. wolnej hematyny.

3) Oznaczanie ilościowe katalazy

Oba gatunki bakterii siarkowych rozkładają nadtlenek wodoru, co wskazuje na obecność katalazy. Zawartość katalazy, oznaczonej w naszych doświadczeniach metodą miareczkową, jest wyrażona przez wartość liczbową *kat. f.*, przy czym *kat. f.* określamy jako stosunek stałej szybkości reakcji k_s do jednostki masy bakterii.

Stałą szybkości reakcji k_s obliczaliśmy, wg Eulera i Josephsona (1927), ze wzoru: $k_s = \frac{1}{t_n - t_{n-1}} \cdot \log \frac{C_{n-1}}{C_n}$

Jako jednostkę masy braliśmy 1 g suchej substancji bakterii.

Tablica III

Oznaczanie ilościowe katalazy

Количественное определяние каталазы

Quantitative estimation of catalase

a) *Thiobacillus thioparus*

A)

t min.	ml $KMnO_4$
0	12,80
5	12,46
10	12,14
20	11,90
25	11,18

B)

t min.	ml $KMnO_4$
0	12,64
3	12,24
6	11,86
12	11,09
15	10,80
30	9,24

C)

t min.	ml $KMnO_4$
0	12,70
10	12,70
30	12,68

Tablica A

10 ml zawiesiny przemytych komórek *Th. thioparus*
20 ml buforu fosforanowego M/30, pH 6,8
63 ml wody redestylowanej
7 ml roztworu H_2O_2 n/7

Tablica B

20 ml zawiesiny przemytych komórek *Th. thioparus*
20 ml buforu fosforanowego M/30, pH 6,8
53 ml wody redestylowanej
7 ml roztworu H_2O_2 n/7

Tablica C

jak w tablicy B, lecz zawiesinę inaktywowano przez zagotowanie.

b) *Thiobacillus thiooxydans*

D)

t min.	ml $KMnO_4$
0	12,22
5	12,06
10	11,92
20	11,60
30	11,28
50	10,76
60	10,52

E)

t min.	ml $KMnO_4$
0	12,28
5	12,14
10	11,98
20	11,70
30	11,36
50	10,86
60	10,64

F)

t min.	ml $KMnO_4$
0	13.1
20	13.1
60	13,02

Tablica D

10 ml zawiesiny bakterii o zawartości 18 mg suchej masy
20 ml buforu fosf. M/30, pH 6,8
63 ml wody redestylowanej
7 ml roztworu H_2O_2 n/7

Tablica E

jak w tablicy D, lecz przez dodanie kwasu fosforowego osiągnięto pH 2,8

Tablica F

jak w tablicy D, lecz zawiesinę zagotowano.

Roztwory badane: A, B, C, umieszczono w termostacie lodowym w 0° w erlenmajerkach o pojemności 300 ml. W odpowiednich odstępach czasu pobierano pipetą po 10 ml roztworu, dodawano po 5 ml 2 n H_2SO_4, sączono i miareczkowano 0,01 n $KMnO_4$. Z tablicy III A obliczono stałą k_s, ekstrapolując dla czasu t = 0. k_s = 0,00234; $k_s \cdot 10^4$ = 23,4, a *kat. f.* = 0,39, gdyż masa bakterii w 100 ml badanego roztworu = 5,9 mg. Z tablicy III B obliczono stałą k_s jak w tabeli A: k_s = 0.00464; $k_s \cdot 10^4 = 46{,}4$, a *kat. f.* = 0,39, gdyż masa bakterii w 100 ml badanego roztworu = 11,8 mg.

Z tablicy III C wynika, że po zagotowaniu zawiesina traci zdolność rozkładania H_2O_2. Również dodatek KCN inaktywuje zawiesinę.

Obliczona z tablicy III D stała szybkości k_s = 0,00116; $k_s \cdot 10^4$ = 11.6, a *kat. f.* = 0,064.

Obliczona z tablicy III E k_s = 0,0010; $k_s \cdot 10^4$ = 10, a *kat. f.* = 0.055.

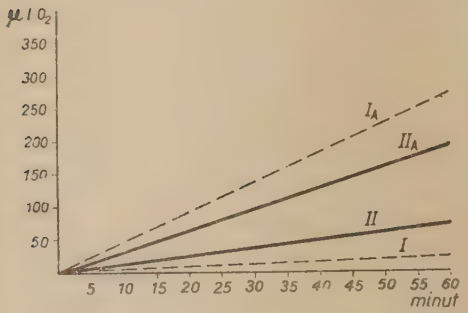
Z tablicy III F wynika, że zagotowanie zawiesiny powoduje zanik zdolności rozkładania H_2O_2.

4) Wykrywanie peroksydazy

Próbę jakościową z benzydyną wykonywaliśmy przed i po zagotowaniu hodowli bakterii. Próba benzydynowa w wypadku *Th. thioparus* wypadła dodatnio, natomiast z *Th. thiooxydans* przed i po zagotowaniu ujemnie.

5) Oznaczanie ilościowe oksydazy cytochromowej

a) *Th. thioparus* daje reakcję z odczynnikiem „nadi". Oznaczenia aktywności oksydazy dokonaliśmy dwoma metodami, wg Stotza i współpracowników (1938) i wg Slatera (1949). Wyniki oznaczeń metodą Stotza podają rys. 1 i 2.



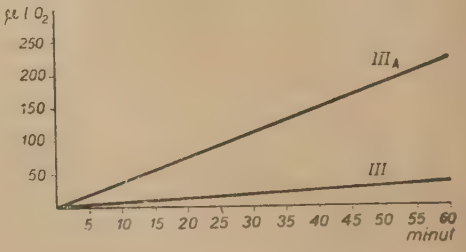
Rys. 1. Oznaczanie oksydazy cytochromowej w *Th. thioparus* p-fenilenodwuaminą i kwasem askorbinowym

Определяние цитохромной оксидазы у *Th. thioparus* посредством p-фенилендиамина и аскорбиновой кислоты

Cytochrome oxidase assay in *Th. thioparus* with p-phenilendiamine (curves: I and IA) and with ascorbic acid (curves: II and IIA) as reductant

Uwaga: Q_{O_2} na mg N przez system:

IA — p-fenilenodwuamina + cytochrom c + zawiesina roztartych komórek
I — p-fenilenodwuamina + cytochrom c + zagotowana zawiesina roztartych bakterii
IIA — kwas askorbinowy + cytochrom c + zawiesina roztartych komórek
II — kwas askorbinowy + cytochrom c + zagotowana zawiesina roztartych komórek.



Rys. 2. Oznaczanie oksydazy cytochromowej w *Th. thioparus* cysteiną

Определяние цитохромной оксидазы у *Th. thioparus* цистеином

Cytochrome oxidase assay in *Th. thioparus* with cysteine as reductant

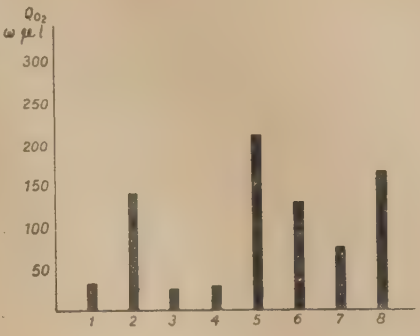
Uwaga: Q_{O_2} na mg N przez system:

III — cysteina + cytochrom c + zagotowana zawiesina roztartych komórek
IIIA — cysteina + cytochrom c + zawiesina roztartych komórek

Bardziej przejrzyście obrazuje nasze oznaczenia rysunek 3, na którym wykresy przedstawiają zużycie tlenu w mikrolitrach w przeliczeniu na 1 mg N w ciągu 1 godziny.

Uwaga: zużycie tlenu w µl w przeliczeniu na mg N bakteryjnego przez system:

1. kw. askorbinowy + cyt. c. + zawiesina roztartych komórek, zagotowana
2. kw. askorbinowy + cyt. c + zawiesina roztartych komórek
3. kw. askorbinowy + zawiesina roztartych komórek
4. p-fenilenodwuamina + cyt. c. + zawiesina roztartych komórek, zagotowana
5. p-fenilenodwuamina + cyt. c. + zawiesina roztartych komórek
6. p-fenilenodwuamina + zawiesina roztartych komórek
7. cysteina + cyt. c. + zawiesina roztartych komórek, zagotowana
8. cysteina + cyt. c. + zawiesina roztartych komórek



Rys. 3. Oznaczanie oksydazy cytochromowej w *Th. thioparus*

Определяние цитохромной оксидазы у *Th. thioparus*

Cytochrome oxidase assay in *Th. thioparus*. Q_{O_2} per mg of bacterial N

Przykład oznaczania aktywności oksydazy cytochromowej w *Th. thioparus* wg S l a t e r a podaje tablica IV.

Stosując metodę S l a t e r a można, odkładając na osi y odwrotność stężenia cytochromu c=1/c, a na osi x odpowiednio:

$1/Q_{O_2}9 - Q_{O_2}6$, $1/Q_{O_2}10 - Q_{O_2}7$, $1/Q_{O_2}11 - Q_{O_2}8$, obliczyć

przez ekstrapolację aktywność oksydazy cytochromowej dla 1/c dążącego do 0, tj. dla nieskończenie dużego stężenia cytochromu. W naszym wypadku aktywność oksydazy cytochromowej obliczona w ten sposób wynosi 200 µl O_2 na mg azotu bakteryjnego. Nie można jednak liczby tej uważać za właściwą aktywność oksydazy cytochromowej, gdyż liczba ta zależy od stopnia roztarcia bakterii. Stopień roztarcia natomiast jest trudny do ilościowego oznaczenia. Stosując poprzednio opisane warunki rozcierania uzyskaliśmy na ogół zgodne wyniki w obu metodach.

b) *Th. thiooxydans*

Na ilość zużytego tlenu nie wywierało wpływu dodanie do zawiesiny roztartych bakterii *Th. thiooxydans* tych samych substratów, które wzmagają zużycie tlenu przez miazgę *Th. thioparus*, a więc p-fenilenodwuaminy, kwasu askorbinowego lub cysteiny. Bez wpływu także było dodanie cytochromu c. Próba z odczynnikiem „nadi" wypadła ujemnie. Wyniki tych doświadczeń przemawiają przeciwko obecności układu cytochromowego w komórkach *Th. thiooxydans*.

Tablica IV

Oznaczanie oksydazy cytochromowej w *Th. thioparus*
Определяние цитохромной оксидазы в *Th. thioparus*
Cytochrome oxidase assay in *Th. thioparus*
t = 38° 0,638 mg N w 5 ml zawiesiny

Naczyńko nr	5	6	7	8	9	10	11	12	4
KOH 20%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Kw. askorbinowy —50 mg/ml	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	—	-
Cytochrom c $1,7 \times 10^{-4}$M	—	0,6	0,9	0,12	0,6	0,9	1,2	—	—
Zawiesina roztartych bakterii	1,6	—	—	—	1,6	1,6	1,6	1,6	—
0,5% NaCl	1,2	0,6	0,3	—	0,6	0,3	—	1,2	—
Bufor fosforanowy pH 7,3	—	1,6	1,6	1,6	--	-	—	0,3	3,1
Q_{O_2}	8	20	25	29	68	77	89	—	—

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przeprowadzone przez nas badania, mające na celu stwierdzenie w drobnoustrojach *Th. thioparus* i *Th. thiooxydans* obecności enzymów o strukturze hemoproteidów a przede wszystkim układu cytochromowego, wykazują, że oba badane typy bakterii różnią się pod tym względem wybitnie między sobą. *Th. thioparus* posiada oksydazę cytochromową i jeden ze znanych cytochromów, mianowicie cytochrom *c*. Nie mogliśmy natomiast wykazać obecności oksydazy cytochromowej ani żadnego cytochromu w komórkach *Th. thiooxydans*.

O występowaniu cytochromu *c* w komórkach *Th. thioparus* świadczą smugi absorbcyjne, położone przy 552 i 523 mμ. Za tym, że jest to istotnie cytochrom *c*, przemawia również wyraźne przesunięcie tych smug ku fiołkowej części widma w temperaturze ciekłego powietrza. Różnice między smugami cytochromu *c* z mięśnia sercowego konia a smugami absorbcyjnymi cytochromu obserwowanymi w *Th. thioparus* leżą w granicach wahań zależnych od gatunku ustroju. Mogą też one do pewnego stopnia wynikać z rozpraszania światła przez mętną zawiesinę bakterii w odróżnieniu od jednorodnego roztworu cytochromu *c* z mięśnia sercowego konia. Poza tym, za przynależnością obserwowanych przez nas smug absorbcyjnych do cytochromu *c* przemawiają następujące fakty: smugi absorbcyjne pozostają niezmienione po krótkotrwałym zagotowaniu, inne zaś cytochromy są, jak wiadomo, ciepłochwiejne; w obecności uretanu smugi cytochromu *a* i *c* znikają po wstrząsaniu z powietrzem, natomiast smugi cytochromu *b* pozostają widoczne; cytochrom obserwo-

wany przez nas nie może być jednak cytochromem *a*, gdyż jego smugi absorbcyjne mają zupełnie inne położenie w widmie.

W dostępnej nam literaturze (Frei, Riedmüller i Almassy 1934, Fujita i Kodama 1934, Porter 1946, Stephenson 1951) opisano występowanie cytochromu *c* u bardzo licznych gatunków drobnoustrojów, z reguły jednak łącznie z innymi cytochromami. Wyłącznie sam cytochrom *c*, jak podają w swych podręcznikach Porter i Stephenson, znaleziono u *Acetobacter pasteurianum, Acetobacter xylinum, meningococcus* i *gonococcus.*

Musimy stwierdzić jednak, że dane te nie są zgodne z literaturą oryginalną. Pozwalamy sobie zatem twierdzić, że *Th. thioparus* należy do bardzo rzadkich, jeżeli nie jedynych poznanych dotąd drobnoustrojów zawierających tylko jeden cytochrom *c*.

Cytochrom *c* nie jest samoutlenialny: utleniany jest tylko przez oksydazę cytochromową. Już sam ten fakt, że w zawiesinie *Th. thioparus* wytrząsanej z powietrzem cytochrom *c* ulega utlenieniu, o czym świadczy zanik jego smug absorbcyjnych, wskazuje na to, że drobnoustrój ten rozporządza również oksydazą cytochromową. Występowanie tego enzymu zostało udowodnione pomiarami ilościowymi. W dostępnym nam piśmiennictwie nie znaleźliśmy wzmianki o badaniach nad stężeniem oksydazy cytochromowej u innych bakterii, tak że na podstawie naszych oznaczeń nie jesteśmy w stanie powiedzieć, czy zawartość oksydazy cytochromowej w *Th. thioparus* znajduje się w tym samym rzędzie wielkości, który jest właściwy dla innych bakterii tlenowych. Zastanawiający jednak jest fakt, że układ cytochromowy występuje w komórkach bakterii rozwijających się w środowisku zawierającym pokaźne stężenie siarkowodoru, a więc czynnika hamującego działanie oksydazy cytochromowej. Poza układem cytochromowym *Th. thioparus* zawiera peroksydazę wykazaną przez nas jakościowo na podstawie odczynu z benzydyną oraz katalazę oznaczoną przez nas ilościowo. Oznaczenia nasze wskazują, że zawartość katalazy jest w nich tego rzędu wielkości, który spotykamy i u innych bakterii tlenowych. Wszystkie powyższe dane wskazują na to, że *Th. thioparus* rozporządza co najmniej trzema enzymami hemoproteidowymi oraz jednym z cytochromów.

Zdecydowanie odmiennie przedstawia się problem układu cytochromowego i hemoproteidów u *Th. thiooxydans*. U bakterii tej stwierdzono brak smug absorbcyjnych cytochromu w tych warunkach doświadczalnych, w których smugi te występują wyraźnie u *Th. thioparus*. Próby wykrycia i ilościowego oznaczenia oksydazy cytochromowej dały w przy-

padku tych bakterii wyniki negatywne. *Th. thiooxydans* jest więc pierwszym dotychczas opisanym drobnoustrojem tlenowym nie posiadającym układu cytochromowego. Nie stwierdzono również obecności peroksydazy. Mimo to bakteria ta nie jest pozbawiona zdolności syntetyzowania układu hemowego, gdyż rozporządza katalazą. Zawartość katalazy jest jednak znacznie mniejsza niż u *Th. thioparus*. Zachodzi tu więc pewnego rodzaju analogia do sytuacji spotykanej u niektórych bezwzględnych beztlenowców; np. *Cl. sporogenes, Cl. histolyticus* nie zawierają — jak w ogóle wszystkie beztlenowce — układu cytochromowego, mają jednak drobne ilości katalazy (Topley i Wilson, 1929).

O tym, że zdolność do wytwarzania katalazy jest w drobnoustrojach najpierwotniejszą funkcją syntetyczną w zakresie syntezy hemoproteidów lub jest zdolnością najdłużej utrzymującą się po zaniku zdolności do wytwarzania innych hemoproteidów, świadczą doświadczenia Granicka (1947). Badacz ten wykazał, że względny beztlenowiec *Leuconostoc mesenterioides*, hodowany na pożywce, w której brak jakiejkolwiek żelazoporfiryny, nie posiada ani układu cytochromowego, ani katalazy. Natomiast po dodaniu żelazoporfiryny do pożywki drobnoustrój ten uzyskuje zdolność rozkładania nadtlenku wodoru.

Th. thiooxydans jest więc zupełnie wyjątkowym bezwzględnym tlenowcem, nie wytwarzającym cytochromów i oksydazy cytochromowej mimo zdolności do syntetyzowania układu hemowego. W ogóle brak układu cytochromowego w komórkach ustrojów żywych dostosowanych do zużywania wolnego tlenu jest zjawiskiem raczej rzadkim; według Huszáka (1942) układu tego brak w komórkach rdzenia nadnerczy. Olbrzymia większość komórek roślinnych zawiera również układ cytochromowy (Goddard, 1944), a w tych wypadkach, gdy go brak w stadium dojrzałości, rośliny zawierają go w pierwszych etapach życia (Michlin i Kolesznikow, 1947).

Procesy oksydacyjno-redukcyjne w *Th. thiooxydans* przebiegają więc bez udziału tak bardzo rozpowszechnionego w przyrodzie ożywionej układu cytochromowego. Ponieważ jednak cyjanki hamują rozwój tych bakterii, należy przypuszczać, że w utlenianiu u tych drobnoustrojów biorą udział jakieś enzymy, w których czynną grupą jest ciężki metal. Konieczne są dalsze badania w tym kierunku, zanim będzie można określić znaczenie tego faktu. Być może, że rozwiązanie tego zagadnienia rzuci światło zarówno na mechanizm przyswajania CO_2 przez te drobnoustroje, jak i na ich pozycję w filogenezie samożywnych bakterii.

Т. В. Щепковски и Б. Скаржински

БИОХИМИЯ АВТОТРОФНЫХ СЕРОБАКТЕРИЙ

Часть I. Цитохромная система и гемопротеидные энзимы у *Th. thioparus* и *Th. thiooxydans*

Резюме

1. Авторы занялись исследованием наличия цитохромной системы и гемопротеидных энзимов в клетках автотрофических серобактерий *Thiobacillus thioparus* и *Thiobacillus thiooxydans*.

2. У *Th. thioparus* обнаружено наличие цитохромной оксидазы и одного лишь цитохрома, который идентичен с цитохромом *c*. Количество оксидазы было определено в произвольно принятых образцовых условиях по методу Слятера и Штоца и выражено величиной Q_{O_2} на мг бактерийного N (Табл. IV, рис. 1, 2, 3). Кроме того установлено наличие каталазы, количество которой было определено *kat. f* (табл. III). На основании качественного анализа обнаружено наличие пероксидазы.

3. *Thiobacillus thiooxydans* не содержит никаких цитохромов ни цитохромной оксидазы, однако эта бактерия содержит маленькие количества каталазы. Несмотря на способность синтезировать гемовый комплекс *Th. thiooxydans* является исключительным аэробом, не пользующимся цитохромной системой. Биологическое значение этого факта подлежит дискуссии.

T. W. Szczepkowski i B. Skarżyński

THE BIOCHEMISTRY OF AUTOTROPHIC SULPHUR BACTERIA

Part. I. The cytochromes and hemoprotein enzymes in *Thiobacillus thioparus* and *Thiobacillus thiooxydans*

Summary

1. The existence of cytochrome system and hemoprotein enzymes in aerobic autotrophic sulphur bacteria, *Th. thioparus* and *Th. thiooxydans* was examined.

2. We were able to demonstrate in *Th. thioparus* the existence of cytochrome oxidase and of only one cytochrome namely cytochrome *c*. We calculated cytochrome oxidase activity under the arbitral standard condition followig Stotz and Slater. The activity of cytochrome oxidase was expressed by the rate of oxygen uptake Q_{O_2}/mg bacterial N. (Figures 1, 2, 3, Table IV). We could demonstrate also in *Th. thioparus* catalase (Table III A) in concentration of the same order as in other bacteria. The existence of peroxidase was demonstrated only in the qualitative manner.

Hence *Th. thioparus* possesses cytochrome system as all other aerobic bacteria, but differs from them by containing only one cytochrome component.

3. In *Th. thiooxydans* we could demonstrate neither cytochromes nor cytochrome oxidase and peroxidase. This microorganism possesses however catalase, but in lower concentration than *Th. thioparus* (Table III F). *Th. thiooxydans* represents therefore the unique obligate aerobic microorganism which possesses no cytochrome system, and consequently cannot carry out oxidation mechanism of the type common for all other aerobic species.

LITERATURA

1. Beijerinck M.: Über die Bakterien welche sich im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können. Zbl. Bakt., II. 1904. **11**: 593. 2. Euler H. i Josephson K.: Über Katalase I. Annalen d Chem 1927. 452:158. 3 Fuji-

ta A. i Kodama T.: Untersuchungen über Atmung und Gärung pathogener Bakterien. Biochem. Z., 1937, 273:186 4. Frei W., Riedmüller L i Almassy F.: Über Cytochrom und das Atmungssystem der Bakterien. Biochem. Z., 1934. 274:253. 5. Goddard R.: Cytochrome C and Cytochrome Oxidase from Wheat Germ. Am. Journ. of Botany. 1944, 31:270. 6. Granick S. i Gilder H.: Distribution, Structure and Properties of the Tetrapyroles, Adv. in Enzymology, 1947, 7.308. 7 Huszák I.: Über die Eisenporphyrinverbindungen in Nebenniere. Biochem. Z., 1942, 312:338. 8. Keilin D. i Hartree E. F.: Purification and Properties of Cytochrome-c., Biochem. J., 1945, 39:289. 9. Keilin D. i Hartree E. F.: Effect of Low Temperature on the Absorbtions Spectra of Haemoproteins. Nature. 1949. 164:254. 10. Le Page G. A.: The Biochemistry of Autotrophic Bacteria, Archiv. of Biochem., 1942, 1:255. 11. Le Page G. A. i Umbreit W. W.: Phosphorylated Carbohydrate Esters in Autotrophic Bacteria. J. of Biol. Chem., 1943 a, 147:263. 12 Le Page G. A. i Umbreit W. W.: The Occurence of Adenosino—3—Triphosphate in Autotrophic Bacteria. J. of Biol. Chem., 1943 b, 148:255. 13. Lipman C. B., Waksman S. i Joffe J. S.: The Oxydation of Sulphur by Soil Microorganisms, Soil Sci. 1921, 12:475. 14. Mac Lean H. C.: The Oxidation of Sulphur by Microorganisms in its Relation to the Availability of Phosphates, Soil Sci. 1918, 5:251. 15. Michlin D. M. i Koleszników P. A.: O dychatielnych systiemach rastienij, Biochimija, 1947, 12:5. 16. Natanson A.: Über eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel. Mitt. Zool. Stat. Neapel, 1902, 15:665. 17. Oparin A. J.: Wozniknowienie Żizni na Ziemlie. Wyd. A.N.Z. S.S.R. Moskwa, 1941. 18. Porter J. G.: Bacterial Chemistry and Physiology, J. Wiley, New—York, 1946. 19. Potter V. R.: Studies on the mechanisms of hydrogen transport in animal tissues, J. of Biol. Chem. 1941, 137:13. 20. Szaposznikow D. J.: Ewolucja fotosyntieza u niższych mikroorganizmow, Mikrobiołogia, 1951, 20:438. 21. Starkey R. L: Concerning the Physiology of *Thio bacillus thiooxydans*, an Autotrophic Bacterium Oxidising Sulphur under Acid Conditions. J. Bact. 1925, 10:135. 22. Starkey R. L.: Cultivation of Organisms Concerned in the Oxidation of Thiosulphate. J. Bact. 1934, 28:365. 23. Starkey R. L.: Products of the Oxidation of Thiosulphate by Bacteria in Mineral Media. J. Gen. Physiol., 1935, 18.325. 24. Slater E. C.: The Measurement of the Cytochrome Oxidase Activity of Enzyme Preparations. Biochem. J 1949. 44:305. 25. Stephenson M.: Metabolizm Bakterij. Tł. rosyjskie A. N. ZSRR, Moskwa, 1951. 26 Stotz E., Sidwell A. E. i Hogness T R.: The Role of the Cytochromes in the Action of „Indofenol Oxidase". J. of Biol. Chem. 1938, 124:733. 27. Sym E.: Proces budowy ciała drobnoustrojów. Post. Hig. i Med. Dośw. 1949, 1:69. 28. Toplev W. W. C. i Wilson S. G.: Principles of Bacteriology and Immunity Arnold, London, 1929. 29. Theorell H.: Reines Cytochrom. C. Biochem. Z. 1936, 285:207. 30. Umbreit W. W., Vogel H. R. i Vogler K. G.: The significance of fat in sulfur oxidation by *Th. thiooxydans*, J. Bact. 1942, 43:141. 31. Vogler K. G., Umbreit W. W.. Studies on the Metabolism of Autotrophic Bacteria, III J. Gen. Physiol. 1942, 26:157. 32. Vogler K. G.: Studies on the Metabolism of Autotrophic Bacteria. J. Gen. Physiol. 1942a. 25:617. 33. Vogler K. G.: Studies of the Metabolism of Autotrophic Bacteria, J. Gen. Physiol. 1942 b. 26:103. 34. Waksman S.: Microorganisms concerned in the oxidation of the soil. J. Bact. 1922, 7:605. 35. Waksman S. i Starkey R. L.: On the Growth and Respiration of Sulfuroxidising Bacteria: J. Gen. Physiol. 1922 5:285 36. Waksman S. i Joffe J. I.: Microorganisms concerned in the oxidation of the soil. J. Bact. 1922, 7:239.

H. Jurkowska

ZDOLNOŚĆ PRZYSTOSOWANIA SIĘ KROPIDLAKA *(ASPERGILLUS NIGER)* DO MIEDZI

Z Zakładu Chemii Rolnej U. J. w Krakowie

Wpłynęło dn. 21. II. 1952 r.

WSTĘP

Raulin (1869) uznał miedź za pierwiastek zbędny dla kropidlaka, ponieważ stosowane przez niego małe dawki soli miedziowej nie pobudzały rozwoju, dawki zaś większe działały toksycznie. Wielu autorów (Richter 1901, Iwanow 1904, Niethammer 1927, Pirschle 1934, 1935) w późniejszych pracach potwierdziło to spostrzeżenie i zaliczyło sole miedzi do trucizn.

Jednakże szereg innych badaczy (Bortels 1927, Fischer 1941, Gollmick 1935, Javillier 1940, Kanter 1904, Mc Hargue i Calfee 1931, Mulder 1939, Ono 1900, Roberg 1928, Tamiya 1928, Wolff i Emmerie 1930) uważał, że miedź stymuluje rozwój kropidlaka. Na pożywkach bez miedzi obserwowali oni słaby rozwój, natomiast wzrastające do pewnej granicy dawki soli miedziowej zwiększały plon grzybni. Dawki przekraczające optimum działały trująco hamując rozwój tym silniej, im były wyższe. Podawane przez różnych autorów optymalne stężenia soli miedziowych różniły się jednak znacznie od siebie.

Sprzeczności pomiędzy wynikami prac różnych badaczy oraz różnice w poglądach na rolę miedzi w rozwoju kropidlaka mają przypuszczalnie wiele różnych przyczyn. Zasadniczą wydaje się ta, że ilości miedzi potrzebne do normalnego rozwoju kropidlaka są bardzo małe, tak że już ślady tego pierwiastka pokrywają zapotrzebowanie. Tak drobne ilości miedzi mogą występować w pożywce jako zanieczyszczenia, znajdują się w najczystszych preparatach chemicznych (Steinberg 1935), w wodzie destylowanej, przechodzą do roztworu ze szkła naczyń itp. oraz mogą występować w zarodnikach użytych do posiewu. Tak więc wyniki

badań, w których fakt ten nie został uwzględniony, nie są ścisłe i nie dają odpowiedzi na pytanie, czy miedź jest dla kropidlaka konieczna i jakie jej dawki należy uważać za optymalne. Błąd ten obarcza wiele doświadczeń, zwłaszcza wcześniejszych. Aby go zmniejszyć, w późniejszych pracach starano się zachować wszelkie środki ostrożności, a nawet oczyszczać już przygotowane pożywki (Bortels 1927, Gollmick 1935, Mulder 1939, Sakamura 1934, Yoshimura 1934, Wolff i Emmerie 1930) oraz zawiesinę zarodników (Steinberg 1935).

Działanie miedzi na kropidlaka zależy ponadto od szeregu czynników, jak: źródła węgla i azotu (Iwanow 1904), obecności pewnych mikroelementów (Mulder 1939, Fischer 1941, Richter 1901), różnych substancji organicznych (Wachter 1907) oraz odczynu pożywki (Tamiya 1928).

Różnice wyników mogą być też spowodowane indywidualnymi właściwościami używanych szczepów, mających niejednakowe zapotrzebowanie miedzi (Mulder 1939). Pulst (1902) stwierdził, że nawet jeden i ten sam szczep potrafi do pewnego stopnia przystosować się do obecności miedzi i słabiej reagować na jej toksyczne działanie.

Wszystkie te zjawiska, ogromnie utrudniające przeprowadzenie ścisłych badań oraz możność porównywania otrzymanych wyników, przyczyniają się do tego, że nie można z całą dokładnością określić ilości miedzi potrzebnej do normalnego rozwoju kropidlaka. Niemniej już dziś można przyjąć, że pierwiastek ten w niezmiernie małych ilościach jest dla tego organizmu konieczny. Drugim znanym zjawiskiem, co do którego zgadzają się wszyscy autorzy, jest toksyczne działanie większych dawek soli miedziowych.

Trujący wpływ miedzi objawia się opóźnieniem kiełkowania zarodników (Waterman 1913, Gollmick 1935), powolnym rozwojem grzybni (Gollmick 1935, Fischer 1941, Mc Hargue i Calfee 1931, Tamiya 1928, Pulst 1902) zmniejszeniem, a przy większych dawkach utratą zdolności zarodnikowania (Roberg 1928, Fischer 1939). Waterman (1913) uważa siarczan miedzi za czynnik mogący wywoływać mutacje u kropidlaka.

Pobieranie miedzi z pożywek stwierdzili Wolff i Emmerie (1930). Mc Hargue i Calfee (1931) znaleźli w popiele po spaleniu grzybni *A. flavus* większe ilości miedzi, gdy pleśń rozwijała się na pożywce zawierającej cynk, a mniejsze, jeśli pożywka zawierała mangan. Obecność miedzi w zarodnikach wykrył Steinberg (1935).

Obserwowano wpływ miedzi na wygląd kożucha kropidlaka (Tamiya 1928) oraz na kształt komórek (Yoshimura 1934, Iwanow 1904).

Niedostatek miedzi w podłożu poza zmniejszeniem masy wytworzonej grzybni osłabia wyraźnie zarodnikowanie kropidlaka: *A. niger*, *A. glaucus*, *A. flavus*, *A. oryzae* (Bortels 1927, Gollmick 1935, Javillier 1940, Steinberg 1935, Mulder 1939, Yoshimura 1934). Stwierdzono również, że obecność miedzi jest konieczna do wytworzenia czarnego barwnika zarodników *A. niger* (Roberg 1928, Gollmick 1935, Mulder 1939). Wpływ miedzi na zabarwienie zarodników został

wykorzystany do oznaczania zawartości przyswajalnej miedzi w glebie za pomocą *A. niger* (Mulder 1939, Smit 1940).

Zdaniem większości autorów (Roberg 1928, Mulder 1939, Sakamura 1934, Fischer 1941) miedź wpływa na podniesienie produkcji kwasów przez kropidlaka, przeczą jednak temu Ono (1900) i Tamiya (1928). Fischer (1941) stwierdził szybszy rozkład skrobi przez *A. niger* w obecności stymulujących dawek miedzi. Iwanow (1904) obserwował zmniejszenie zawartości glikogenu w grzybni pod wpływem miedzi. Mc Hargue i Calfee (1931) stwierdzili w grzybni *A. flavus* mniejszą procentowo zawartość azotu, większą natomiast zawartość tłuszczu i składników popielnych. W obecności miedzi wzrosła w popiele ilość fosforu, wapnia i żelaza.

Zjawisko stymulującego działania miedzi na rozwój kropidlaka, niezbędność jej do normalnego jego rozwoju, niemożność zastąpienia jej przez jakikolwiek inny mikroelement (Mulder 1939, Bortels 1927, Roberg 1928) oraz obecność jej w grzybni, a zwłaszcza w zarodnikach, dowodzi, że spełnia ona jakąś funkcję w przemianie materii tej pleśni. Jednakże poza obserwacjami dotyczącymi wpływu miedzi na tworzenie zarodników literatura dostarcza mało danych wyjaśniających rolę, jaką miedź odgrywa w życiu kropidlaka. Przytoczone obserwacje mają przeważnie charakter fragmentaryczny i przypadkowy, a co więcej, często nie są ze sobą zgodne.

Jakkolwiek literatura dotycząca wpływu miedzi na kropidlak jest dość bogata, zagadnienie zdolności przystosowania się tego organizmu do miedzi nie było szczegółowo opracowane.

W r. 1902 Pulst ogłosił wyniki swoich badań nad odpornością i przystosowaniem się różnych pleśni, m. in. *A. niger*, do miedzi. Jego doświadczenia dotyczyły jednak głównie *Penicillium glaucum*, która to pleśń okazała się najbardziej odporna i najbardziej zdolna do przystosowania. Autor ten opiera się przede wszystkim na zdolności zarodników do kiełkowania przy różnych stężeniach soli miedziowych. Prace tego rodzaju nie były kontynuowane.

BADANIA WŁASNE

Przedmiotem badań w niniejszej pracy była zdolność przystosowawcza kropidlaka (*A. niger*) do dużego stężenia siarczanu miedzi. Praca ta miała dać odpowiedź na następujące pytania:

a) czy kropidlak dzięki kolejnemu przeszczepianiu na pożywki zawierające stosunkowo dużą dawkę miedzi przystosuje się do tej dawki,

b) czy forma przystosowana różnić się będzie od nieprzystosowanej pod względem morfologicznym, fizjologicznym i biochemicznym,

c) czy przystosowanie to będzie trwałe.

Badania rozpoczęto we wrześniu 1949 r., ukończono w lutym 1951 r.

METODA BADAŃ

Badania przeprowadzono na czystej hodowli kropidlaka czarnego *(Aspergillus niger)*.

W ciągu prowadzenia doświadczeń zachowywano jednakowe, niżej podane warunki.

Jako pożywkę płynną stosowano roztwór wodny o następującym składzie: 10% sacharozy, 0,5% NH_4NO_3, 0,5% KH_2PO_4, 0,25% $MgSO_4 . 5 H_2O$, ślady $FeCl_3$. Odczyn pożywki wynosił około pH 4. Pożywkę rozlewano po 50 ml (w niektórych doświadczeniach po 100 ml) do kolb Erlenmeyera o pojemności 300 ml i wyjaławiano 3-krotnie w odstępach jednodniowych przez pół godziny w temperaturze 100°.

Roztwór siarczanu miedzi wyjaławiano oddzielnie i wprowadzano do kolb, które miały zawierać miedź, w takiej ilości, by stężenie tego metalu wynosiło 0,1142% (0,449% siarczanu miedzi). pH pożywek z miedzią wynosiło około 3,7. Podobnie postępowano z azotanem i chlorkiem miedzi oraz z siarczanami: cynku, niklu i manganu. Ilości ich przeliczono tak, by stężenie metalu równało się zawsze 0,1143%. Sole te stosowano indywidualnie, tzn., że pożywka zawierająca jeden z wymienionych metali innych nie zawierała. Przy stosowaniu dużych dawek siarczanu miedzi sól tę dodawano w formie stałej

Przygotowując pożywki o niższym pH zakwaszano je przed wyjaławianiem 1 n H_2SO_4 do pH 1,4. Przygotowując pożywki o dużym stężeniu cukru przed wyjaławianiem dodawano do każdej kolby po 30 g cukru, a więc w 50 ml pożywki znajdowało się łącznie 35 g cukru.

Na podłożu stałym hodowlę prowadzono na agarze skośnym.

Hodowlę prowadzono w temperaturze 30°. Okres hodowli w poszczególnych doświadczeniach był różny, zależnie od szybkości rozwoju pleśni oraz wytwarzania zarodników.

Przy badaniach nad przemianą materii każda seria zawierała po 5 powtórzeń; przy oznaczaniu suchej masy grzybni 2—4 powtórzenia. Wszystkie liczby podawane w tablicach oraz na rysunkach są średnimi arytmetycznymi otrzymanych wyników.

Po zakończeniu hodowli grzybnię oddzielano od pożywek przez odsączenie i przemywano wodą destylowaną, którą zbierano wraz z przesączem (z wyjątkiem pożywek, w których oznaczano pH i kwasowość ogólną). Przesącz dopełniano wodą destylowaną do 500 ml i poddawano analizie chemicznej. Odsączoną i przemytą grzybnię ważono w celu oznaczenia świeżej masy. Następnie w celu oznaczenia suchej masy grzybnię suszono w temperaturze 60° w ciągu 24 godzin, po czym podwyższano temperaturę do 100° i suszono aż do otrzymania stałej wagi.

Odczyn pożywek po zakończeniu hodowli badano w próbkach nie rozcieńczonych wodą; pH oznaczano metodą potencjometryczną.

Kwasowość ogólną oznaczano w 30 ml nierozcieńczonej pożywki wyrażając ją w ml 1/10 n NaOH.

Ilość cukru zużytą przez pleśń obliczano z różnicy między zawartością cukru w pożywce przed i po zakończeniu hodowli. Cukier oznaczano metodą Bertranda.

Zawartość azotu w grzybni oznaczano metodą Förstera. Dla zbadania formy pobranego z pożywki azotu oznaczano w niej azot amonowy i azotanowy metodą kolorymetryczną, a otrzymane wartości odejmowano od ilości azotu zawartych w niezasianej pożywce.

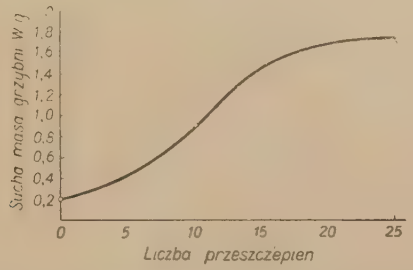
Zawartość popiołu w grzybni oznaczano przez spopielanie jej w tygielkach kwarcowych nad palnikiem gazowym.

Ilość pobranej miedzi obliczano z różnicy między początkową zawartością miedzi w pożywce a zawartością jej po zakończeniu hodowli. Miedź oznaczano jodometrycznie metodą Haen—Löw.

OPIS DOŚWIADCZEŃ

1. Badania nad zdolnością adaptacyjną kropidlaka

Dwie serie pożywek płynnych, jedną bez miedzi, drugą zawierającą 0,449% siarczanu miedzi, zaszczepiono zarodnikami kropidlaka. Po 17 dniach dokonano przeszczepienia zarodników z grzybni wyrosłej na pożywce bez miedzi na świeżą pożywkę nie zawierającą tego składnika. Zarodniki utworzone na grzybni w pożywce z miedzią przesiano na świeżą pożywkę z miedzią. Powtarzano takie przeszczepienia 25-krotnie, co 17 dni. Formę rozwijającą się w środowisku zawierającym miedź nazwano formą B, a formę kontrolną rosnącą na pożywce bez miedzi nazwano formą A, przy czym cyframi arabskimi oznaczono kolejny numer przesiewu.



Rys. 1. Krzywa ilustrująca stopniowe przystosowywanie się kropidlaka do wzrostu w środowisku zawierającym 0,449% $CuSO_4 . 5 H_2O$

Кривая, иллюстрирующая постепенное приспособление *Aspergillus niger* к среде, содержащей 0,449% $CuSO_4 . 5H_2O$

The gradual adaptation of *Aspergillus niger* to the medium containing 0,449% of $CuSO_4 . 5 H_2O$

W celu oznaczenia stopnia i przebiegu adaptacji kropidlaka postępowano w ten sposób, że co 5 przeszczepień przesiewano zarodniki formy B na pożywkę miedziową i oznaczano po 17 dniach suchą masę jej grzybni oraz grzybni odpowiedniego przeszczepienia formy B. Gdy forma A była przeszczepiana na pożywkę z miedzią, zaznaczano to dopisując obok litery A symbol Cu. Przebieg przystosowania się kropidlaka do środowiska zawierającego 0,1143% miedzi ilustruje rysunek 1.

Niezależnie od poprzedniego doświadczenia, w którym przeszczepiano kropidlak na pożywki o stałym stężeniu siarczanu miedzi dokonano innego doświadczenia, a mianowicie przesiewano go na pożywki zawierające coraz wyższe stężenie tej soli. Po wielokrotnych przeszczepieniach i osiągnięciu stężenia wynoszącego 5% zakażono pobranymi z tej hodowli zarodnikami pożywki o wzrastającym stężeniu siarczanu miedzi (5, 10, 20% oraz roztwór nasycony, gdzie na dnie kolby znajdowały się nierozpuszczone kryształki tej soli).

2. Charakterystyka formy przystosowanej i nie przystosowanej

A. Wzrost formy przystosowanej i nie przystosowanej na pożywce zawierającej 0,449% siarczanu miedzi.

Tablica I

Własności biochemiczne form: przystosowanej i nie przystosowanej, hodowanych na pożywce z 0,449% siarczanu miedzi oraz na pożywce bez miedzi

Биохимические свойства приспособленной и неприспособленной форм, культивированных на питательной среде с 0,449% медного купороса и на среде без меди

The biochemical characters of an adapted and unadapted forms grown in the medium with 0,449% of copper sulphate added and in the medium without copper

Charakterystyka wzrostu	Pożywka z siarczanem miedzi 0,449%		Pożywka bez miedzi	
	forma $A_{15}Cu$	forma B_{15}	forma A_{15}	forma B_{15}
świeża masa grzybni, g	14,84	37,78	20,97	31,32
sucha masa grzybni, g	1,0510	2,1517	3,2010	3,4764
% suchej masy	7	6	15	11
ilość cukru w g zużyta na wytworzenie 1 g s. m. grzybni	4,4	3,1	3,0	2,6
% N w s. m. grzybni	9	6	4,8	3,8
ilość N w mg, pobranego na 1 g zużytego cukru	21	22	17	14
nadwyżka $N—NH_4$ nad $N—NO_3$ pobranego przez pleśń w mg	39	13	17	35
% popiołu w s. m. grzybni	3,34	4,43	4,61	6,30
pH pożywki (początkowe 3,7)	1,90	1,79	2,22	1,60
kwasowość ogólna 30 ml pożywki, wyrażona w ml 1/10 n NaOH (początkowa 12,00)	27,00	31,70	21,50	63,40
% miedzi w s. m. grzybni	1,1	3,2		

Jedną serię kolb (zawierających po 100 ml pożywki) zaszczepiono zarodnikami pochodzącymi z hodowli A_{15}, drugą z B_{15}. Hodowlę prowadzono przez 18 dni. Wyniki zebrano w tabl. I.

B. Wzrost formy przystosowanej i nie przystosowanej na pożywkach zawierających różne sole miedzi oraz sole innych metali.

Przygotowano pożywki zawierające siarczan, chlorek oraz azotan miedzi. Część ich zaszczepiono zarodnikami A_{25}, część B_{25}. Hodowla trwała 18 dni. Zasiano również tym samym materiałem pożywki z siarczanem cynku, manganu i niklu, przy czym hodowla na solach cynku i manganu trwała 6 dni, na soli niklu 15 dni.

Wyniki podaje tabl. II.

Tablica II

Sucha masa grzybni (w g) form: przystosowanej i nie przystosowanej, hodowanych na pożywkach z różnymi solami miedzi i innych metali

Сухая масса мицелия (в г) приспособленной и неприспособленной форм культивированных на средах с разными солями меди и других металлов

The dry mass (in g) of mycelium of an adapted and unadapted forms in the media with various copper-salts and salts of others metals

Sól dodana do pożywki	Czas hodowli	Forma A_{25}	Forma B_{25}
siarczan miedzi	18 dni	0,3355	1.5400
chlorek miedzi	18 „	0.6098	2,0430
azotan miedzi	18 „	0,4672	1,0950
siarczan cynku	6 „	0.4895	2,3460
siarczan manganu	6 „	1,7958	2,1865
siarczan niklu	15 „	brak rozwoju	1,1638

C. Wzrost formy przystosowanej i nie przystosowanej w środowisku silnie zakwaszonym oraz w środowisku o wysokim stężeniu cukru

Tablica III

Sucha masa grzybni (w g) form: przystosowanej i nie przystosowanej, hodowanych na pożywkach silnie kwaśnych oraz zawierających zwiększoną dawkę cukru

Сухая масса мицелия (в г) приспособленной и неприспособленной форм на очень кислых питательных средах и содержащих увеличенное количество сахара

The dry mass (in g) of the mycelium of an adapted and unadapted forms in the very acid media and in the media containing greater concentration of sugar

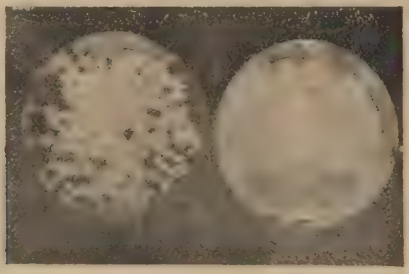
Rodzaj pożywki	Forma A_{25}	Forma B_{25}
pożywka o pH 1,4	1,0221	1,5507 ,
pożywka z 35 g cukru	0,7877	nie oznaczono, rozwój b. słaby

Pożywki zakwaszone do pH 1.4 oraz pożywki zawierające po 35 g cukru w 50 ml zakażono zarodnikami formy A_{25} i B_{25}. Hodowlę prowadzono przez 9 dni. Wyniki zebrane są w tabl. III.

3. Badania nad stopniem utrwalenia się własności nabytych oraz charakterystyka formy odzwyczajanej

A. Wzrost formy przystosowanej i nie przystosowanej na pożywce bez miedzi

Jedną serię pożywek bez miedzi zaszczepiono zarodnikami pochodzącymi z grzybni formy A_{15}, drugą z B_{15}. Hodowlę prowadzono przez 8 dni. Różnice w rozwoju obu form przedstawia rysunek 2, wykonany w 4 dniu hodowli.



Rys. 2. Wzrost formy przystosowanej (B_{15}) i formy nie przystosowanej (A_{15}) na agarze odżywczym

Рост приученной (B_{15}) и неприученной (A_{15}) форм на питательном агаре

The growth of an adapted (B_{15}) and unadapted form (A_{15}) on the nutrient agar

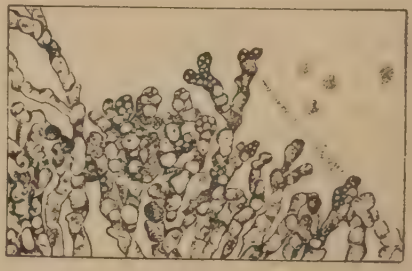
Różnice w obrazie mikroskopowym podają rysunki 3 i 4.

Wyniki zebrane są w tabl. I.

Rys. 3. Grzybnia formy nie przystosowanej; podłoże agarowe.

Мицелий неприученной формы; агар без меди

The mycelium of an unadapted form from the nutrient agar



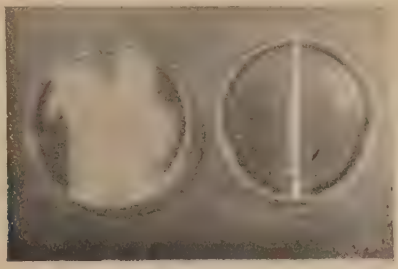
Rys. 4. Grzybnia formy przystosowanej; podłoże agarowe.

Мицелий приученной формы; агар без меди

The mycelium of an adapted form from the nutrient agar

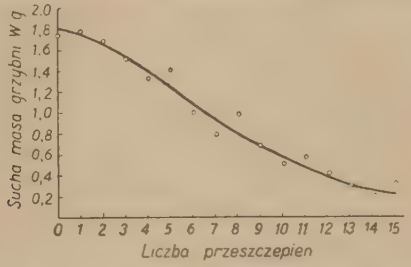
B. Przebieg odzwyczajania

Zarodniki formy A_{15} i B_{15} przesiano na agar skośny. Rozwój obu form ilustruje rysunek 5, wykonany w 4 dniu hodowli.



Rys. 5. Wzrost 4-dniowej hodowli formy A_1' i C, na agarze
Рост форм A_1' и C_1 на питательном агаре
The growth of A_1' and C_1 forms on the nutrient agar

Zarodniki wytworzone przez grzybnię rozwijającą się na agarze przesiewano na agar. Tę nową, odzwyczajoną od miedzi linię nazwano formą C, przy czym cyfra obok tej litery oznacza kolejny przesiew rozwijający się na agarze bez miedzi. Dla kontroli przesiano na agar również formę nie przystosowaną A_{15} oznaczając ją przez A' i numer kolejnego przeszczepienia na agarze. Z każdego pokolenia A' i C pobierano zarodniki i zasiewano nimi pożywkę zawierającą 0.449% siarczanu miedzi.



Rys. 6. Krzywa ilustrująca proces odzwyczajania się kropidlaka od podwyższonego stężenia siarczanu miedzi
Кривая, иллюстрирующая постепенное отучение *Aspergillus niger* от среды, содержащей медный купорос
The gradual loss of the acquired resistance to higher concentrations of copper-sulphate in medium in *Aspergillus niger*

Hodowlę prowadzono przez 17 dni, po czym oznaczano suchą masę grzybni. Krzywa na rysunku 6 przedstawia przebieg odzwyczajania kropidlaka od stosowanego poprzednio stężenia miedzi.

C. Wzrost formy odzwyczajanej i formy nie odzwyczajanej na pożywce bez miedzi

Zarodniki formy A'_{10} i C_{10} wprowadzono do pożywki bez miedzi. Hodowla trwała 7 dni. Wyniki podaje tabl. IV.

Tablica IV

Sucha masa grzybni, odczyn i kwasowość ogólna hodowli formy odzwyczajanej i formy nie przystosowanej na pożywce bez miedzi oraz na pożywce z miedzią

Сухая масса, реакция и общая кислотность питательной среды отученной и неприспособленной форм на среде без меди и на среде с медным купоросом

The dry mass of mycelium, pH and total acidity in the culture of an secondarly unresistant form and an unadapted form in the copper - less media and in the media containing copper salts

Charakterystyka wzrostu	Pożywka bez miedzi		Pożywka z miedzią	
	forma A'_{10}	forma C_{10}	forma A'_{10} Cu	forma C_{10} Cu
sucha masa grzybni	1,2855	1,3858	0,1748	0,3815
pH pożywki (początkowe 4,00)	1,60	1,44	2,43	2,09
kwasowość ogólna	64,80	99,00	24,3	27,9

D. Wzrost formy odzwyczajanej i formy nie przystosowanej na pożywce zawierającej 0,449% siarczanu miedzi

Zarodnikami pochodzącymi z formy A'_{10} i C_{10} zaszczepiano pożywki z miedzią. Hodowlę prowadzono przez 17 dni. Wyniki podaje tablica IV.

Podobne doświadczenia przeprowadzono z formami C_5 i C_{15} w porównaniu z A'_5 i A'_{15}.

E. Wzrost formy odzwyczajonej i formy nie przystosowanej na pożywce zawierającej sole innych metali

Zarodniki formy A'_{10} i C_{10} przesiano na pożywki zawierające siarczan cynku, manganu i niklu w ilościach odpowiadających 0,1143% metalu. Hodowle przy dwu pierwszych solach prowadzono przez 6 dni, przy siarczanie niklu przez 15 dni. Wyniki podaje tablica V.

F. Wzrost formy odzwyczajanej i formy nie przystosowanej na pożywkach o wysokim stężeniu cukru

Zarodniki formy A'_{10} i C_{10} wsiano do pożywki zawierającej 35 g cukru w 50 ml. Forma A'_{10} wytworzyła grzybnię, której sucha masa wynosiła 0,7527, forma C_{10} — 0,4722 g.

Tablica V

Sucha masa grzybni (w g) formy odzwyczajanej i formy nie przystosowanej na pożywce z siarczanem cynku, manganu lub niklu

Сухая масса мицелия (в г) формы отученной и формы неприспособленной на среде с сернокислым цинком, марганцом и никлем

The dry mass (in g) of the mycelium of an secondarly unresistant and unadapted forms, grown in the media containing zinc-, manganese- and nickel-sulphate

Sól dodana do pożywki	Czas hodowli	Forma A'_{10}	Forma C_{10}
siarczan cynku	6 dni	0 2768	0,4360
siarczan manganu	6 „	1,7658	1.8658
siarczan niklu	15 „	brak rozwoju	0,1300

WYNIKI

Wyniki badań dadzą się streścić w następujących punktach:

1. Stosowane stężenie siarczanu miedzi, wynoszące 0,449%, działa na kropidlak silnie toksycznie, czego wyrazem jest opóźniony i powolny rozwój, opóźnione i słabe zarodnikowanie oraz niski plon wytworzonej grzybni (po 17 dniach sucha masa grzybni wynosiła około 0.2 g).

2. Kropidlak hodowany w ciągu wielu przesiewów przy wymienionym stężeniu siarczanu miedzi stopniowo przystosowuje się do niego. Kiełkowanie zarodników następuje nieco wcześniej, grzybnia rozwija się znacznie silniej (po 25 przeszczepieniach sucha masa 17 dniowej grzybni wynosiła około 1.7 g, czyli o 1.5 g więcej aniżeli sucha masa 17-dniowej grzybni nie przystosowanej), zarodnikowanie jest nieco wcześniejsze. Szybkość przystosowania się jest początkowo większa, następnie zmniejsza się (rys. 1). Osiągnięcie przez kropidlak wysokiego stopnia przystosowania w stosunkowo krótkim czasie, obejmującym kilkanaście przeszczepień, dowodzi pewnej łatwości przyzwyczajania się tej pleśni do nowych warunków.

Kropidlak przeszczepiany kolejno na pożywki o coraz wyższym stężeniu miedzi uodparnia się na jej trujące działanie tak dalece, że może się rozwijać i zarodnikować w środowisku nasyconym siarczanem miedzi.

3. Forma przystosowana do 0,449% siarczanu miedzi różni się od formy nie przystosowanej, rosnącej na pożywce o tym samym stężeniu miedzi, własnościami morfologicznymi, fizjologicznymi i biochemicznymi. Wygląd grzybni jest nieco odmienny: komórki formy przystosowanej są silniej zdeformowane, skrócone i rozdęte, w grzybni formy przystosowanej zawartość procentowa azotu jest mniejsza, a popiołu i miedzi —

większa. Forma ta pobiera mniej cukru na wytworzenie 1 g s. m., silniej obniża pH i daje wyższą kwasowość ogólną.

4. Forma przystosowana do siarczanu miedzi jest jednocześnie mniej wrażliwa na działanie innych soli miedzi jak np. azotanu i chlorku miedzi.

5. Forma ta jest też bardziej wytrzymała na działanie innych metali, jak cynk, nikiel i mangan. Ze stosowanych metali, najbardziej trujący okazał się dla kropidlaka nikiel, w mniejszym stopniu cynk, najsłabiej zaś działał w użytym stężeniu mangan.

6. Forma przystosowana do siarczanu miedzi znosi lepiej duże stężenie jonów wodorowych dając na pożywce o pH początkowym 1.4 większą masę grzybni niż forma nie przystosowana.

7. Forma przystosowana na pożywce zawierającej wysokie stężenie cukru rozwija się znacznie gorzej niż forma nie przystosowana.

8. Forma przystosowana przeszczepiona na pożywkę bezmiedziową różni się od formy nie przystosowanej rosnącej na takiej samej pożywce, przy czym różnice te przeważnie pokrywają się z różnicami występującymi między obu formami na pożywce zawierającej miedź.

9. Forma przystosowana do miedzi w wyniku kolejnych przeszczepień na pożywki bezmiedziowe stopniowo traci swą odporność na toksyczny wpływ tego pierwiastka (rys. 2).

10. Forma odzwyczajana w ciągu 15 pokoleń nie wraca do formy wyjściowej zatrzymując pewne nabyte cechy morfologiczne, fizjologiczne i biochemiczne.

DYSKUSJA

Na podstawie niniejszej pracy trudno jest twierdzić, co było ostatecznie powodem zwiększonej na skutek adaptacji odporności kropidlaka na toksyczne działanie miedzi.

Najprawdopodobniej długotrwałe działanie miedzi przestawiło przemianę materii pleśni wytwarzając nową równowagę między organizmem a otoczeniem, umożliwiając lepszy jej rozwój. Łatwość przystosowania się dowodziłaby dużej plastyczności aparatu enzymatycznego warunkującego przestawienie metabolizmu. O zmienionej przemianie materii świadczą różnice w składzie chemicznym grzybni, w ilości i postaci pobranych składników pokarmowych, produkcji kwasów itp. u formy przystosowanej i nie przystosowanej. Silniejsze wytwarzanie kwasów a zwłaszcza obecność kwasu szczawiowego, powoduje być może wytrącanie się miedzi w postaci szczawianu, który osadza się na dolnej powierzchni grzybni lub w błonie komórkowej. O wytrącaniu miedzi przez kwas szczawiowy wytworzony przez *A. niger* wspomina Pulst (1902).

Pewnego rodzaju przystosowaniem się do toksycznego środowiska mogą być także zmiany w kształcie komórek; ich zaokrąglanie prowadzi do zmniejszenia powierzchni w stosunku do objętości, dzięki czemu kontakt ich z otaczającym środowiskiem zmniejsza się. Chemomorfozę u *A. niger* pod wpływem czynników zewnętrznych obserwowali Raciborski (1905) i Frey (1927).

Nie jest wykluczone, że w czasie przeszczepień kropidlaka na pożywki zawierające miedź następowała pewna selekcja zarodników, część ich bowiem wkrótce po wykiełkowaniu przestawała się rozwijać i opadała na dno. Możliwe, że rozwijały się tylko te, które z nieznanych, wewnętrznych przyczyn były odporniejsze na trujące działanie miedzi. Wyjaśnić to mogłoby jednak dopiero zbadanie zmienności w obrębie populacji. Jest również możliwe, że martwe strzępki grzybni wchłonęły część miedzi ułatwiając rozwój zarodnikom później kiełkującym lub wydzielały jakieś substancje zmniejszające jej toksyczność wywierając ten sam skutek.

Ciekawy jest fakt, że kropidlak przystosowany do miedzi jednocześnie przystosowuje się do innych metali. Dokładniejsze opracowanie tego zjawiska mogłoby ułatwić wyjaśnienie istoty adaptacji względem miedzi. Nie wykluczone, że pleśń broniąc się przed toksycznym działaniem miedzi wytworzyła pewien mechanizm zmniejszający przepuszczalność błonki plazmatycznej, utrudniający wnikanie miedzi do komórek. Zjawisko to może dotyczyć także innych metali.

Przypuszczenie, że długotrwałe działanie szkodliwego czynnika, jakim jest wysokie stężenie miedzi, wytworzyło formę odporniejszą na wszelkie nie sprzyjające rozwojowi warunki, jest mało prawdopodobne. Tak np. w pożywce zawierającej wysokie stężenie cukru kropidlak przystosowany do miedzi rozwijał się znacznie słabiej.

W związku z opóźnionym i powolnym rozwojem pleśni w środowisku zawierającym wysokie stężenie miedzi należy podkreślić, że bardzo ważnym czynnikiem w badaniach nad toksycznością jakiejś substancji jest czas trwania doświadczenia. Tak np. przy 3-dniowej hodowli można by wyciągnąć fałszywy wniosek, że nawet przyzwyczajony do dużych stężeń miedzi kropidlak nie może się rozwijać w roztworze nasyconym. Przy 17-dniowej lub krótszej hodowli można by błędnie wnioskować, że w takich warunkach pleśń wytwarza wprawdzie grzybnię, lecz nie jest zdolna do zarodnikowania.

Na zakończenie należy podkreślić najbardziej charakterystyczną cechę formy przystosowanej do miedzi, a mianowicie zwiększoną produkcję kwasów, czego dowodzi niższe pH i wyższa kwasowość ogólna pożyw-

wek, na których rozwijała się ta właśnie forma. Cecha ta zaznacza się we wszystkich stosowanych pożywkach nawet wówczas, gdy wytworzony plon grzybni formy przystosowanej był niższy aniżeli nie przystosowanej. Ponadto występuje ona również u formy odzwyczajanej.

Г. Юрковска

СПОСОБНОСТЬ АДАПТАЦИИ К МЕДИ *ASPERGILLUS NIGER*

Резюме

Предметом исследований в настоящей работе является адаптивная способность *Aspergillus niger* к меди. Для этой цели многократно пересаждались плесневые грибки на питательные среды, содержащие 0,449% медного купороса. Затем автор рассматривает признаки приспособленной и неприспособленной форм. Наконец много раз пересаждалась адаптивная форма на питательную среду без медных солей и снова автором были разобраны характерные черты отучиваемой формы. Автором установлено, что *Aspergillus niger* привыкает постепенно к определенной концентрации медного купороса (Рис. 1). Приспособленная форма отличается от неприспособленной: на медной питательной среде сухая масса мицелия достигает 1,7 г, в то время как сухая масса исходной формы в таких же условиях составляла лишь 0,2 г. *A. niger* постепенно привыкает к меди в такой степени, что на питательной среде насыщенной медным купоросом растет и образует споры.

Клетки приспособленной формы гораздо короче и более круглые, количество азота меньше, а золы и меди больше, чем у исходной формы. Приспособленная форма расходует меньше сахара для синтезы 1 г сухой массы и продуцирует больше кислот. Вместе с большей устойчивостью против высоких концентраций $CuSO_4$ появляется устойчивость против других солей меди и солей никля, марганца и цинка (табл. I–V). Во время пересаждания на безмедные питательные среды приспособленная форма постепенно теряет устойчивость против меди (Рис. 6), однако все еще отличается в морфологическом и физиологическом отношении от неприспособленной формы.

H. Jurkowska

THE ADAPTATION OF *ASPERGILLUS NIGER* TO COPPER

Summary

These researches were conducted on the adaptation of *Aspergillus niger* to copper-salts.

The mould was subcultured many times on the fluid medium with 0.449% $CuSO_4 . 5 H_2O$ added.

It was shown that during subculturing adaptation to copper takes place (Fig. 1). There are marked differences between adapted and unadapted form. On the fluid medium with $CuSO_4$ the 17-day mycelium of adapted form has a dry mass 1.7 g. while the weight of the mycelium of unadapted form is on the copper-medium only 0.2 g. Gradually *A. niger* can be adapted to medium saturated with $CuSO_4$.

Cells of an adapted form are shortened and rounded (Fig. 4 and 5). The content of nitrogen is lower, of ash and copper is much higher in mycelium of adapted than of unadapted form. The adapted form metabolises less sugar on the 1 g of dry matter synthesised; its production of acids is greater (Table 1).

The adapted to $CuSO_4$ form is also resistant to higher concentrations of others copper-salts and to salts of nickel, manganese and zinc (Tables I—V).

The acquired resistance to higher concentrations of $CuSO_4$ is gradually diminishing during repeated subculturing on copper-less medium (Fig. 2).

This new unresistant form arising from an adapted form never reverts wholly to the normal, parental form and retains some morphological and physiological characters of an adapted form.

LITERATURA

1. Bortels H.: Über die Bedeutung von Eisen, Zink und Kupfer für Mikroorganismen. Biochem. Zts, 1927, **183**:301. **2.** Fischer J.: Schwermetallwirkungen auf *Aspergillus niger*. Planta, 1941, **32**:395. **3.** Frey A.: La formation des cellules géantes du *Sterigmatocystis nigra*. Rev. Gen. de Bot. 1927, **39**:277. **4.** Gollmick F.: Der Einfluss von Zink, Eisen, Kupfer und deren Kombination auf das Wachstum von *Aspergillus niger*. Zentrbl. für Bakt. Abt. II. 1935. **93**:421. **5.** Hargue J. S. i Calfee R. K.: Effect of manganese, copper and zinc on growth and metabolism of *Aspergillus flavus* and *Rhizopus nigricans*, The Bot. Gaz. 1931. **91**:183. **6.** Iwanow K. S.: Über die Wirkung einiger Metallsalze und einatomiger Alkohole auf Entwicklung von Schimmelpilzen. Zentbl. für Bakt. Abt. II, 1904. **12**:139. **7.** Javillier M.: Cuivre et *Aspergillus niger*., Biol. Abstr. 1940, **14**:1203. **8.** Kanter R. M.: Über die Wirkung von Salze der Schwermetalle auf das Wachstum und die chemische Zusammensetzung von *Aspergillus niger*. Bot. Zentrbl. 1904. **95**:369. **9.** Mulder E. G.: On the using of micro-organisms in measuring a deficiency of copper, magnesium and molybdenum in soils. Antonie van Leeuwenhoek, 1940, **6**:99. **10.** Mulder E. G.: Über die Bedeutung des Kupfers für Wachstum von Mikroorganismen und über eine mikrobiologische Methode zur Bestimmung des Pflanzenverfügbaren Bodenkupfers. Arch. für Mikrob. 1939, **10**:72. **11.** Niethammer A.: Die Stimulationswirkung von Giften auf Pilze und das Arndt-Schulzsche Gesetz. Biochem. Zts. 1927, **148**:370. **12.** Ono N.: Über die Wachstumsbeschleunigung einiger Algen und Pilze durch chemische Reize. J. of Col. Sci. Imp. Uniw. of Tokyo. 1900. **13**:143. **13.** Pirschle K.: Vergleichende Untersuchungen über die physiologische Wirkung der Elemente nach Wachstumsversuchen mit *Aspergillus niger*. Planta 1934, **23**:177. **14.** Pirschle K.: Weitere Untersuchungen über die vergleichsweise-Wirkung der Elemente nach Wachtumsversuchen mit *Aspergillus niger*. Planta, 1935, **24**:649. **15.** Pulst K.: Die Widerstandsfähigkeit einiger Schimmelpilze gegen Metallgifte. Jahr. für wissen. Bot. 1902, **37**:205. **16.** Raciborski M.: Einige Chemomorphosen des *Aspergillus niger*. Bul. Inter. de l'Acad. des Sci. de Cracovie. 1905:764. **17.** Richter A.: Zur Frage chemischen Reizmittel. Zentrbl. für Bakt. Abt. II. 1901, **7**:417. **18.** Raulin J.: Études chimiques sur la végétation.. Ann. Sci. Nat. Bot. 1869, **11**:93. wg Roberg M. **19.** Roberg M.: Über die Wirkung von Eisen, Zink- und Kupfer-salzen auf *Aspergillen*. Zentrbl. für Bakt. Abt. II. 1928, **74**:333. **20.** Sakamura T.: Ammonio-und Nitratophilia bei *Aspergillus niger* im besonderen Zusammenhang mit Schwermetallen. J. of Sci. Hokkaido Imp. Univ. 1934, **3**:121. **21.** Smit J.: *Aspergillus niger* comme indicateur d'un manque de cuivre dans

les terreaux et dans les plantes. Biol. Abstr. 1940, **14**:548. **22.** Steinberg R.: Nutrient-solution purification for removal of heavy metals in deficiency investigations with *Aspergillus niger*. J. of. Agric. Res. 1935, **51**:413. **23.** Tamiya H.: Studien über die Stoffwechselphysiologie von *Aspergillus oryzae*. Acta Phytochim. 1928/29, **4**:77. **24.** Waterman H. J.: Mutation bei *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger*. Ztschr. für Gärungsphys. 1913, **3**:1. **25.** Wachter W.: Zur Kenntnis der Wirkung einiger Gifte auf *Aspergillus niger*. Zentrbl. fur Bakt. Abt. II. 1907, **19**:176, 272. **26.** Wolff L. K. i Emmerie A.: Über das Wachstum des *Aspergillus niger* und den Kupfergehalt des Nährbodens. Biochem. Zts., 1930, **228**:443. **27.** Yoshimura F.: Spherical cell formation in *Aspergillus oryzae* with special reference to heavy metal impurities in culture solution J. of Sci. Hokkaido Imp. Univ. 1934, **3**:89.

Powyższa praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr Tadeusza Lityńskiego, któremu za wskazówki i pomoc na tym miejscu serdecznie dziękuję.

W. Maliszewska

CHARAKTERYSTYKA MIKROBIOLOGICZNA GLEB Z DOŚWIADCZEŃ STATYCZNYCH W GOŁĘBIEWIE

Z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej U.M.C.S. w Lublinie
i Działu Mikrobiologii I.U.N.G. w Puławach.

Wpłynęło dn. 7.IX.1951 r.

Kształtowanie się żyzności gleby i plonowanie roślin są, jak wiadomo, silnie związane z aktywnością drobnoustrojów glebowych (Williams, Krasilnikow, Miszustin i inni), która w wysokim stopniu zależy od wpływu środowiska.

Jakość i aktywność zespołów drobnoustrojów zależy w glebach od wielu czynników, a więc od warunków klimatycznych, od reliefu, rodzaju gleby oraz od wszelkich zabiegów uprawowo-nawozowych, włącznie ze stosowanym płodozmianem.

Poznanie tych zależności i wyciągnięcie z nich należytych wniosków dla rolnictwa praktycznego — to jedno z najważniejszych zadań dzisiejszej mikrobiologii ekologicznej. Świadczą o tym liczne prace, zwłaszcza mikrobiologów radzieckich, którzy badają wpływ na mikroflorę takich czynników, jak rodzaj roślin (Krasilnikow 1934, 1940, 1941, Bieriezowa 1950, Afanasiewa 1950, Dorosiński i Łazarew 1949 i inni), rejon geograficzny i wysokość nad poziomem morza (Miszustin i Mirzojewa 1950, Siewierin 1909, Krasilnikow 1947, Kriss 1947), rodzaj nawożenia (Kriuczkowa 1934, Obrazcow 1935, Bieriezowa 1951) lub struktura gleby (Henkel i Butylin 1935). Badane są przy tym całe zespoły drobnoustrojów lub też aktywność poszczególnych ich grup w glebach.

U nas badań takich dotąd przeprowadzono stosunkowo niewiele, mimo zapoczątkowania ich przez Dzierzbickiego już w r. 1910.

Praca niniejsza została przeprowadzona na zlecenie Rady Naukowej przy Ministrze Rolnictwa i Reform Rolnych jako jedno z ogniw zespołowego opracowania doświadczeń statycznych w Zakładzie Rolniczo-Doświadczalnym w Gołębiewie, w pobliżu Kutna.

Od r. 1913 prowadzone były w Gołębiewie, stale na jednym miejscu, doświadczenia statyczne w następujących kombinacjach:

1. Trójpolówka „ciężka"
rośliny: buraki, jęczmień, żyto,
kombinacje nawozowe: nawozy mineralne i obornik.
2. Trójpolówka „lekka"
rośliny: ziemniaki, owies i żyto,
kombinacje nawozowe: nawozy mineralne bez obornika.
3. Pięciopolówka
rośliny: ziemniaki, buraki, jęczmień, koniczyna czerwona i żyto,
kombinacje nawozowe: nawozy mineralne i obornik.

Gleba na całym obszarze objętym doświadczeniami statycznymi jest jednolitego typu próchniczo-bielicowego na podłożu gliniastym. Gleby te nie są zakwaszone, pH ich waha się w granicach od 6,0 — 7,2.

Przeprowadzona przez M. Niklewskiego (1949) analiza wyników tych doświadczeń wykazała, że poletka kontrolne od wielu lat nie nawożone dają jeszcze wysokie plony (od 17 do 27 q żyta z ha); sama gleba jest więc bardzo żyzna. Niklewski stwierdził też dodatnie działanie obornika nawet na koniczynę dawaną w 4 roku po nawozie.

W związku z zaprowadzaniem w Polsce płodozmianów łąkowo-polowych powyższy materiał doświadczalny zyskał na aktualności i postanowiono przebadać różne cechy gleb spod doświadczeń w Gołębiewie, a m. in. stan ich mikroflory. Na bogactwo mikroflory w tych glebach zwróciła uwagę Ziemięcka (1932) badając metodą mikroskopową ilość bakterii w różnych kombinacjach nawozowych i znajdując miliardy komórek na 1,0 g suchej masy gleby nawet na poletkach kontrolnych, nie nawożonych.

Nasze badania mikrobiologiczne przeprowadzono na próbkach pobranych z dwu doświadczeń statycznych: pięciopolówki i trójpolówki „lekkiej", przy czym uwzględniono wpływ pory roku, rodzaju nawożenia i roślin uprawianych na aktywność biologiczną gleb.

Plan i metody badań

Próbki glebowe pobierano w ilości około 0,5 kg z 3 miejsc każdego poletka w pięciopolówce i po jednej próbce z każdego poletka w trójpolówce. Poletka w obu doświadczeniach były 1-arowe, trzykrotnie powtórzone w każdej kombinacji. Próbki pobierano z warstwy powierzchniowej (10—15 cm głębokości). Daty pobrania: 11.IV, 7.VII i 4.XI.1949 r. Wszystkie próbki przechowywano następnie w szczelnych słojach w chłodnym miejscu. Zbyt wilgotne próbki (wiosenne) nieco przesuszono. Przed użyciem do badań mikrobiologicznych przyrządzano próbkę gleby średnią dla każdego poletka w wypadku doświadczenia statycznego w pięciopolówce. W sumie zbadano z pięciopolówki 52 próbki, a z trójpolówki 24 próbki gleby. Tablica I zawiera opis zbadanych gleb.

Badania mikrobiologiczne objęły: 1) ogólną ilość bakterii tlenowych, 2) stosunek ilościowy między komórkami wegetatywnymi a sporami bakterii, 3) ogólną ilość promieniowców, 4) ogólna ilość grzybów, 5) ilość nitryfikatorów, 6) ilość denitryfikatorów, 7) przybliżoną ilość azotobaktera i jego reagowanie na nawożenie fosforowe i wapniowe w glebie, 8) rozkład błonnika.

Do badań tych zastosowano następujące metody:

Ogólne ilości bakterii, promieniowców i pleśni — metoda płytkowa, pożywka

Tablica I

Opis zbadanych gleb Zakładu Dośw. Rolniczego w Gołębiewie

Характеристика исследованных почв Сельско-Хоз. Опытной Станции в Голембеве

Description of the investigated soils on Agric. Exp. Station in Gołębiew r. 1949

Rodzaj doświadczenia	Nawożenie		Roślina	% wody w próbkach glebowych w cyfrach zaokrąglonych			pH gleb		
				wiosna *	lato	jesień	wiosna	lato	jesień
pięciopolówka	0		koniczyna	8	7	4	6,8	6,5	6,3
			ziemniaki	—	5	3	—	6,5	6,0
	obornik	1945	koniczyna	6	7	4	7,1	6,8	6,5
		1949	ziemniaki	—	5	4	—	6.6	6,1
	PKN		koniczyna	—	7	3	—	6.5	6.1
			ziemniaki	—	5	3	—	6,3	6.1
trójpolówka	0		owies	—	5	3	—	6,9	7,0
	PK		owies	6	6	3	6,8	7,1	6,9
	PKN		owies	8	6	3	6,8	7,2	7,0

*) % wody w glebach po ich przesuszeniu w pracowni

agarowa z wyciągiem glebowym. Dla bakterii i promieniowców podłoże o pH około 7,0; dla pleśni pH około 5,0. Wysiew gleby na płytki z odpowiednich jej rozcieńczeń i hodowla płytkowa w temperaturze 28° przez 5 dni. Przy oznaczaniu ilości spor bakterii — potrzebne rozcieńczenia gleby pasteryzowano przed dokonaniem wysiewu przez 15 minut w 80°. Powtórzeń równoległych przy obliczaniu ilości bakterii i promieniowców — 10, przy obliczaniu ilości pleśni i spor bakterii — 6.

Ilość nitryfikatorów i denitryfikatorów oznaczano w pożywkach płynnych, stosując również metodę rozcieńczeń gleby.

Pożywka dla nitryfikatorów wg Winogradskiego (1947), w ilości po 50 ml na erlenmajerkę o pojemności 250 ml.

Hodowla po zaszczepieniu w temperaturze 28° przez 10 dni. Obecność powstających NO_2 i NO_3 wykrywano za pomocą kwasu sulfanilowego z alfanaftyloaminą oraz dwufeniloaminy. Ilość powtórzeń — 3 w 3 rozcieńczeniach.

Pożywka dla denitryfikatorów — syntetyczna z sacharozą i azotanem potasu, po 25 ml do próbówek o pojemności około 30 ml i hodowla w temperaturze 28° przez 72 godziny. Co 24 godziny przeprowadzano proby z dwufeniloaminą, kwasem sulfanilowym z alfanaftyloaminą oraz badano za pomocą papierka lakmusowego wytwarzanie się amoniaku. Ilość powtórzeń: po 3 w trzech rozcieńczeniach.

Ilość azotobaktera i jego reagowanie na Ca i na P określano stosując metodę „płytek plastycznych" Winogradskiego i Ziemięckiej (1929).

Energię rozkładu błonnika badano też bezpośrednio w glebie. W płytkach Petriego napełnionych luźno złożoną glebą umieszczano kwadraty z płótna o powierzchni około 4 cm². Po 20 dniach hodowli w 28 określano stopień zaatakowania błonnika oraz rodzaj czynnych przy tym grup drobnoustrojów. Każdą próbkę gleby badano w 8 powtórzeniach.

Wszystkie otrzymane wyniki ilościowe przeliczano na 1.0 g suchej masy gleby. W tablicach podano średnie otrzymane dla 3 równoległych poletek każdej kombinacji doświadczenia polowego.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Na podstawie wyników naszych badań przeprowadzonych w latach 1949 — 1950 i zgrupowanych w tablicach II — IV możemy ogólnie scharakteryzować gleby Zakładu Dośw. Roln. w Gołębiewie jako bardzo bogate w mikroflorę bakteryjną, co potwierdza wyniki badań mikrobiologicznych tych gleb przeprowadzonych w r. 1932 przez Ziemięcką. Wystarczy rzut oka na tabl. II, III i IV, by stwierdzić, że ilość bakterii na 1.0 g gleby dochodzi — przy metodzie płytkowej — do setek milionów, nawet na poletkach kontrolnych od lat nie nawożonych.

Stosując tę metodę znaleźli np. Gołębiowska i Falkowski (1951) tylko dziesiątki milionów bakterii na 1.0 g gleby szczerkowej.

Spośród zbadanych grup drobnoustrojów mikroflora bakteryjna jest stosunkowo najliczniejsza. Dość liczne są również w tych glebach promieniowce, które , jak zobaczymy dalej (tabl. IV), w niektórych porach roku i przy niektórych kombinacjach nawozowych przewyższają nawet ilość bakterii.

W procesach denitryfikacyjnych tych gleb biorą udział wyłącznie bakterie: krótkie pałeczki i częściowo laseczki. Wśród bakterii nitryfikacyjnych znaleziono rodzaj *Nitrosomonas*.

Azotobakter w glebach Gołębiewa występuje w dużej ilości, zwłaszcza na poletkach nawożonych obornikiem (pięciopolówka — tabl. III i IV), na poletkach z nawozami mineralnymi oraz w kontroli (trójpolówka — tabl. II).

Przy rozkładzie błonnika jest czynna przeważnie mikroflora bakteryjna typu długich laseczek lub drobnych pałeczek, dająca na powierzchni błonnika barwne plamy: najczęściej żółte, także zielone, cieliste, pomarańczowe i fiołkowe. Pleśnie rozwijały się również na błonniku, lecz mniej licznie tworząc czarny lub śnieżnobiały nalot.

Mikroflora pleśniowa jest w tych glebach na ogół bardzo uboga i stanowi, bez względu na porę roku, rodzaj nawożenia i inne czynniki, stale tylko ułamki procentowe całkowitej ilości mikroflory (tabl. II — IV).

Taki stosunek liczbowy bakterii i promieniowców do grzybów wynika zapewne ze stosunkowo wysokiego odczynu tych gleb i z dobrych ich własności buforowych przy zasobności w próchnicę.

Tablica II

Ilość drobnoustrojów w glebach spod owsa w trójpolówce

Количество микроорганизмов в почвах из под овса в трехполие

Quantities of microorganisms in soils from under oats in three fields rotation

Pora roku	wiosna			lato		jesień		
Grupy drobnoustrojów / Nawożenie	PK	PKN	O	PK	PKN	O	PK	PKN
ogólna ilość drobnoustrojow	373	661	16	26	45	29	23	19
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ogólna ilość bakterii	360	641	5	12	28	16	22	4
	96,9%	96,9%	30,9%	45,9%	61,9%	55,0%	95,0%	20,0%
% bakterii w postaci spor	0,1	0,06	20	6	4	6	5	25
Actinomycetales	13	20	11	14	17	13	1	15
	3,0%	3,0%	69,0%	54,0%	38,0%	44,9%	4,9%	79,9%
Fungi	0,03	0,05	0,007	0,04	0,01	0,005	0,009	0,02
	<0,1%	<0,1%	<0,1%	0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%	0,1%
nitryfikatory:								
nitrosobakterie	10	100	100	10	10	10	10	100
nitrobakterie	<10	<10	10	10	10	10	10	10
denitryfikatory	10^8	10^8	10^7	10^6	10^8	10^8	10^7	10^6
Azotobacter:								
występowanie	+	+	+	+	+	+	+	+
reagowanie na nawozy	O	O	P	O	O	O	O	O
energia rozkładu celulozy	++	++	+	+	+	+	+	+

I. Wpływ pory roku i warunków meteorologicznych na rozwój mikroflory

Badania te przeprowadzono na glebach w r. 1949. Analizowano gleby na wiosnę (kwiecień), latem (lipiec) i późną jesienią (listopad).

Jak wynika z danych meteorologicznych, wiosna r. 1949 odznaczała się dużą wilgotnością, w lipcu zaś panowała susza i pobrane do analiz

próbki gleby zawierały bardzo mało wilgoci. Jesień tego roku była równie sucha i gleby pobierano w stanie silnie przesuszonym.

O wiosennym „przebudzeniu się gleby" świadczą badania np. Stacji Doświaczalno - Rolniczej w Rothamsted, jak również Waszyngtońskiej Stacji Rolniczo - Doświadczalnej (V a n d e c a v e y e i K a t z n e l s o n, 1938) wykazujące, że mikroflora jest najliczniejsza w glebach na wiosnę. W badanych przez nas glebach stwierdziliśmy też bardzo wyraźny wzrost ilości bakterii na wiosnę. Pod owsem na wiosnę było ich kilka-

T a b l i c a III

Ilości drobnoustrojów w glebach spod koniczyny w pięciopolówce

Количество микроорганизмов в почвах из под клевера в пятиполие

Quantities of microorganisms in soils from under clover in five-fields rotation

Pora roku / Nawożenie — Grupy drobnoustrojów	wiosna		lato			jesień		
	O	obornik*)	O	obornik*)	PKN	O	obornik*)	PKN
ogólna ilość drobnoustrojów	56	71	8	15	8	33	32	56
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ogólna ilość bakterii	47	64	5	9	4	12	15	21
	84,0%	90,0%	62,0%	60,0%	50,0%	36,0%	46,9%	37,0%
% bakterii w postaci spor	1	1	11	8	16	12	100	30
Actinomycetales	8	7	3	6	4	21	17	35
	15,9%	9,9%	37,3%	39,8%	49,3%	65,9%	53,0%	62,6%
Fungi	0,07	0,1	0,06	0,03	0,06	0,02	0,01	0,02
	0,1%	0,1%	0,7%	0,2%	0,7%	<0,1%	<0,1%	0,4%
nitryfikatory:								
nitrosobakterie	100	1000	10	10	10	10	100	100
nitrobakterie	100	1000	5	10	5	10	10	10
denitryfikatory	10^8	10^8	10^6	10^6	10^6	10^6	10^5	10^7
Azotobacter:								
występowanie	+	++	++	++	+		+	+
reagowanie na nawozy	Ca i P	P	Ca i P	P	Ca i P	Ca i P	P	P
energia rozkładu celulozy	+++	++	++	+++	+	+	+	+

*) dany przed 4-ma laty

Tablica IV

Ilość drobnoustrojów w glebach spod ziemniaków w pięciopolówce

Количество микроорганизмов в почвах из под картофеля в пятиполие

Quantities of microorganisms in soils from under potatoes in five-fields rotation

Pora roku / Nawożenie — Grupy drobnoustrojów	lato			jesień		
	O	obornik*)	PKN	O	obornik*)	PKN
ogólna ilość drobnoustrojów	8	15	14	25	50	84
	100%	100%	100%	100%	100%	100%
ogólna ilość bakterii	4	8	7	11	19	15
	50,0%	53,0%	50,0%	44,0%	38,0%	17,9%
% bakterii w postaci spor	15	11	10	18	9	15
Actinomycetales	4	7	7	14	31	69
	49,4%	46,5%	49,9%	55,9%	61,9%	82,0%
Fungi	0,05	0,08	0,02	0,02	0,02	0,02
	0,6%	0,5%	0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%
nitryfikatory:						
nitrosobakterie	10	100	5	10	10	10
nitrobakterie	5	100	5	10	10	10
denitryfikatory	10^5	10^6	10^6	10^7	10^6	10^6
Azotobacter:						
występowanie	++	++	++	+	++	+
reagowanie na nawozy	Ca i P	P	P	Ca i P	P	P
energia rozkładu celulozy	+	+++	+++	+	+	+

*) dany przed rokiem

Objaśnienia do tabl. II, III i IV

Ogólna ilość bakterii, promieniowców, grzybów i suma drobnoustrojów podane w milionach na 1,0 g s. m. gleby.

Ilości nitryfikatorów i denitryfikatorów podane jako ilość komórek na 1,0 g s. m. gleby.

Ilość azotobaktera:
+ — mało
++ — średnio
+++ — dużo

Rozkład celulozy:
+ — słaby
++ — średni
+++ — silny

naście razy więcej niż latem i jesienią. Wiosenną zwyżkę ilości bakterii zanotowano też w glebach pod koniczyną. Nie zbadano tu bliżej, czy zwyżki te wynikały po prostu z lepszego stanu nawilgocenia gleby, czy też z innych powodów.

Tę silną dynamikę bakterii na wiosnę dobrze ilustruje stosunek ilościowy ich komórek wegetatywnych do nieczynnych spor. Prawie wszystkie znalezione komórki były w stanie czynnym, latem zaś, a szczególnie jesienią ilość spor silnie wzrastała. Zwłaszcza na polu z koniczyną z obornikiem danym przed 4 laty ilość spor dochodziła jesienią do 100% (tabl. III).

Na wiosnę dominowały w badanych glebach bakterie z grupy ziarniaków, w lecie natomiast i na jesieni środowisko opanowywały laseczki i w mniejszym stopniu pałeczki.

Ilość promieniowców była najwyższa na jesieni (tabl. III i IV). Przypuszczalnie było to związane z zaawansowanym shumusowaniem pozostałych po zbiorach resztek roślinnych (Ziemięcka i współpracownicy 1934, 1950, Ruschman i współpracownicy 1941).

Zmiana stosunku liczbowego między bakteriami a promieniowcami w okresie letnim i jesiennym na korzyść tych ostatnich mogła wynikać z różnych ich wrażliwości na suszę (Waksman 1931). Promieniowce mogą znosić większe odwodnienie środowiska, inne zaś bakterie w tych warunkach giną lub przechodzą w formy przetrwalnikowe.

Pora roku nie wpływa wyraźnie na ilość grzybów.

Spomiędzy zbadanych grup bakterii na wiosnę zwiększa się wyraźnie ilość bakterii denitryfikacyjnych (do 100 milionów na 1,0 g gleby na wiosnę, a najwyżej do miliona na 1,0 g latem i na jesieni).

Ilość nitryfikatorów wyraźnie się powiększała na wiosnę, ale tylko w poletkach pod koniczyną. Na ogół nie wyśledzono w naszych badaniach wpływu pory roku na nitryfikację.

Nie stwierdzono również wpływu pory roku na liczebność azotobaktera, ale należy zaznaczyć, że zbadano ją tylko orientacyjnie.

Rozkład błonnika w glebie był nieco silniejszy na wiosnę i latem niż na jesieni.

II. Wpływ nawożenia

Spomiędzy kombinacji nawozowych w obu doświadczeniach statycznych wybrano do badań następujące: 1) kontrola bez nawozów 2) PK, 3) PKN, 4) obornik.

W bezobornikowej trójpolówce, na glebie spod owsa widzimy silny wpływ N mineralnego, a także PK na ogólną ilość bakterii (tabl. II). Nie

zauważono jednak wyraźnego wpływu tego nawożenia na zbadane grupy fizjologiczne bakterii: nitryfikatory, azotobakter, denitryfikatory, bakterie błonnikowe. PK i N w nawozach mineralnych działały dodatnio na liczebność promieniowców, natomiast nie zaznaczył się ich wpływ na ilość grzybów. Próba azotobaktera nie wykazuje potrzeby wapnowania i nawożenia fosforem tych gleb o lekko alkalicznym odczynie (tabl. I). W ramach naszych badań nie mogliśmy stwierdzić, jakie grupy drobnoustrojów reagują dodatnio na nawożenie mineralne.

W pięciopolówce prócz kontroli zbadano tylko gleby nawożone obornikiem lub PKN (tabl. III i IV). Na pierwszy plan wysuwa się tu działanie obornika. Nawet w 4 lata po wynawożeniu nim poletek spowodował on silną zwyżkę ilości bakterii, co widzimy w wypadku pola z koniczyną (tabl. III). Z wyjątkiem próbek gleby pobranych spod koniczyny jesienią i odznaczających się słabą czynnością bakterii, w innych zbadanych glebach pięciopolówki wpływ obornika zaznaczył się korzystnie. Mianowicie obornik podwyższył ilość bakterii czynnych, na co wskazuje malejący odsetek spor w stosunku do ogólnej ilości bakterii. Obornik wpływał też dodatnio na nitryfikatory, a także na promieniowce i na azotobaktera; na inne grupy bakterii działanie jego było mniej wyraźne. Na ilość pleśni działania obornika nie stwierdzono.

W porównaniu z obornikiem działanie mineralnego PKN na mikroflorę było w pięciopolówce słabsze, ale również dodatnie. Na jesieni, w glebach pod koniczyną, było nawet silniejsze niż obornika w stosunku do ogólnej ilości bakterii i promieniowców. Nie zaznaczył się jednak wpływ PKN na poszczególne grupy bakterii i na ilość grzybów. W próbie azotobaktera gleby te z reguły reagowały na nawożenie fosforowe (tabl. III i IV), przy czym gleby z poletek kontrolnych reagowały też na Ca i miały odczyn nieco niższy niż inne poletka (tabl. I).

Większą ilość bakterii w doświadczeniu statycznym z trójpolówką można tłumaczyć tym, że w trójpolówce odczyn gleb utrzymywał się na wyższym poziomie niż w pięciopolówce.

Ciekawe było porównanie wyników naszych analiz z analizami Ziemięckiej, wykonanymi na tych samych glebach około 25 lat temu (r. 1932). Za pomocą metody mikroskopowej Thorntona i Graya obliczono wówczas bezpośrednio w glebach ilość bakterii i promieniowców, przeprowadzono próbę azotobaktera i oznaczono jego ilość metodą wysiewu na podłoża krzemionkowe. Poniżej cytujemy niektóre z otrzymanych wówczas wyników.

Gleby kontrolne zawierały wówczas dużą ilość bakterii. Ilość ich silnie wzrastała nie tylko pod wpływem świeżych dawek PKN; stwier-

Tablica V

Ogólna ilość drobnoustrojów i azotobaktera przy różnym nawożeniu wg Ziemięckiej
Próbki glebowe zebrano jesienią (11.X.1932 r.) spod buraków

Rodzaj nawożenia	Ogólna ilość drobnoustrojów w milionach na 1,0 g s. m. gleby	Ilość komórek azotobaktera na 1,0 g s. m. gleby	Reagowanie azotobaktera na nawożenie
I. kontrola — od 16 lat nie nawożona	450	200	P
II. obornik dany przed 5 latami	600	700	Ca i P
III. PKN (bez obornika) + $CaCO_3$ dany w roku badawczym	700	3000 — 14000	O

wg rękopisu.

dzono prawie równie wyraźny dodatni wpływ obornika danego przed 5 latami. Wpływ nawożenia na azotobaktera był wyraźny.

Mimo różnic metodycznych i różnic w czasie badania wyniki Ziemięckiej i nasze są zbieżne. Jasne jest, że żyzne gleby Gołębiewa reagują wydatnie na nawożenie obornikiem i że działanie jego na dynamikę glebową trwać może 4 a nawet 5 lat. Mikroflora reaguje tam również wdzięcznie na nawożenie mineralne, ale na ogół w stopniu słabszym niż na organiczne. Specjalnie dobrze działało nawożenie PKN na jesieni.

III. Wpływ płodozmianu i poszczególnych roślin

Gleby w trójpolówce „lekkiej" obsiane w roku badawczym owsem (r. 1949) wykazały o wiele większe bogactwo drobnoustrojów niż gleby w pięciopolówce spod koniczyny i ziemniaków. Pod owsem ilość bakterii przekraczała na wiosnę pół miliarda komórek na 1,0 g gleby, pod koniczyną zaś było ich w tym czasie około 10 razy mniej. Pod owsem były też większe ilości promieniowców, a z bakterii specjalnie silnie rozwinął się azotobakter. Dodatnie działanie owsa na mikroflorę gleby stwierdził też Starkey (1929, 1931). W wypadku zbadanych tu gleb silny rozwój bakterii pod tą rośliną mógł wynikać z różnych powodów, choćby z tego, że odczyn tych gleb i zaopatrzenie ich w Ca i P było lepsze niż pod koniczyną i ziemniakami.

W pięciopolówce gleby pod ziemniakami charakteryzują się stosunkowo małą czynnością bakterii, gdyż z ogólnej ich ilości do 20% wystę-

puje w postaci przetrwalnej. Zapewne lepsza uprawa mechaniczna potrzebna przy okopowych wpłynęła na to, że w glebach pod ziemniakami znaleziono stosunkowo mało denitryfikatorów.

Gleba pod koniczyną, jako gorzej przewietrzana, zawierała większą ilość denitryfikatorów. Skład jej mikroflory poza tym niewiele się różnił od składu mikroflory gleb spod ziemniaków.

Najkorzystniejsze były by zatem układy mikroflory w glebach pod owsem.

Wobec różnic w typach płodozmianów i pewnych różnic we własnościach samych gleb (np. pH) jest nam jednak trudno określić na podstawie zebranych danych, jaki był wpływ uprawy poszczególnych roślin na dynamikę mikrobiologiczną. Musimy też zaznaczyć, że nie badano tu rhizosfery roślin, ale glebę spoza bezpośredniego zasięgu ich korzeni.

STRESZCZENIE WYNIKÓW I OGÓLNE WNIOSKI

Badania nasze przeprowadzone w r. 1949 wykazały, że znane z żyzności gleby Zakładu Doświadczalno-Rolniczego w Gołębiewie, zawierają dużą ilość bakterii, a także promieniowców, małą natomiast ilość mikroflory pleśniowej.

Spomiędzy poszczególnych grup bakterii bardzo licznie rozwijają się w tych glebach denitryfikatory, zwłaszcza pod uprawami utrudniającymi dostęp powietrza do gleby (koniczyna — tabl. III, także owies — tabl. II).

Nitryfikatorów znaleziono w tych glebach mało. Być może, iż wynikało to ze zbytniej suchości badanych gleb, na co bakterie te są bardzo wrażliwe.

Azotobakter występuje dość licznie, zwłaszcza w lekko alkalicznych glebach, cechujących trójpolówkę w tym Zakładzie.

Rozkład błonnika nie był specjalnie silny i dokonywały go, wg naszych badań, głównie bakterie.

Z poszczególnych czynników zaznaczają się:

I. Wpływ pory roku

1. Najsilniejszy rozwój bakterii (między innymi nitryfikatorów i denitryfikatorów) w glebie stwierdzono na wiosnę, bez względu na rodzaj nawożenia i rośliny.

2. Wiosną dominowały w glebie bakterie z rodzaju ziarniaków, latem i na jesieni pałeczki.

3. Lato i jesień wpływały na zwiększenie ilości form spoczynkowych bakterii, co być może, łączyło się z panującą wówczas suszą.

4. Ilość promieniowców wzrastała na jesieni.

5. Na ilość azotobaktera, drobnoustrojów rozkładających błonnik i na mikroflorę pleśniową wyraźnego wpływu pory roku nie stwierdzono.

II. Wpływ nawożenia

1. Na zwiększenie ilości bakterii w postaci czynnej (m. in. na bakterie błonnikowe i na azotobakter) w badanych glebach wpływał najsilniej obornik.

2. Nawozy mineralne zwiększały również ogólną ilość bakterii, lecz w mniejszym stopniu niż obornik (tabl. IV).

3. Promieniowce występują najliczniej przy nawożeniu PKN (tabl. III i IV).

4. Na bakterie czynne przy procesie nitryfikacji i denitryfikacji oraz na rozwój pleśni rodzaj nawożenia nie miał wyraźnego wpływu.

III. Wpływ rośliny

Spomiędzy gleb pobranych spod owsa (trójpolówka), spod koniczyny i ziemniaków (pięciopolówka) najbogatsze w bakterie i promieniowce były gleby spod owsa. Przyczyny tego mogły jednak leżeć w naturze samej gleby.

Na ogół w zbadanych glebach przejawił się najsilniej w stosunku do ich dynamiki mikrobiologicznej: 1) wpływ pory roku złączony ze stopniem nawilgocenia gleb, oraz 2) z czynników nawozowych — działanie obornika. Długotrwałość działania obornika na mikroflorę w glebach tego typu jest bardzo interesująca. Łącznie z obserwacjami M. Niklewskiego, który wykazał dodatnie działanie obornika na koniczynę jeszcze w 4 roku, rzucałoby to nowe światło na znaczenie nawozowe obornika dla całego płodozmianu.

В. Малишевска

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЧВ НА ОСНОВАНИИ СТАТИЧЕСКИХ ОПЫТОВ В ГОЛЕМБЕВЕ

Резюме

Задачей автора было выяснить, в какой степени севооборот и разные удобрения влияют на ассоциации микроорганизмов в очень урожайных почвах Опытной Станции Голембев. Эти почвы принадлежат к типу подзолов богатых перегноем, которые после многих лет без удобрений дают еще хорошие урожаи.

Автором установлено, что в этих плодотворных почвах навоз стимулирует общий рост бактерий больше чем минеральный N и что он еще активен в этом отношении на 4-й год (табл. II, III).

На полях засеянных овсом обнаружено гораздо больше микроорганизмов чем на картофельных, или клеверных полях (табл. II–IV).

Влияние времен года на обилие микрофлоры выступает сравнительно ясно Особенно хорошие условия для ее развития представляет весна.

W. Maliszewska

THE MICROBIAL CHARACTERISTICS OF THE SOILS FROM STATICAL EXPERIMENTS IN AGR. EXP. STATION GOŁĘBIEW

Summary

This investigation was made to find out the relationship between the soil microbial associations and different plant cultures on the one hand and the method of manuring in statical field trials on the other.

The soils investigated are of the podsol type, rich in humus and are very fertile; they give high yields even on control plots receiving no manure for many years.

It has been found, that dung applied to these soils had a remarkably stimulating effect upon the soil bacteria even 4 years after its application; the influence of mineral N is less marked (Tables II, III).

Oats seems to stimulate the bacterial flora more than do the potatoes or clover, however the trials ought to be repeated im that respect (Tables II — IV).

The strong activation of microbial life in soils during Springtime was noted (Tables II, III).

LITERATURA

1. Afanasiewa A. A.: Mikrobiołogiczeskije processy w poczwie pod mnogoletnimi trawami. Agrobiołogia, 1950, 5:60. **2.** Bieriezowa E. F.: Wzaimootnoszenije rastienni s mikrofloroj poczwy. Agrobiołogia, 1950, 5:73. **3.** Bieriezowa E. F.: Diejstwije minieralnogo i organominieralnogo granulirowannogo superfosfata na mikrofloru poczw. Dokł. Ws.Akad. Siel. Choz. Nauk. Sielchozgiz. Moskwa 1951. **4.** Dorosiński L. M. i Łazarew N. M.: Rol mikroorganizmow w korniewom pitanii rastienii. Agrobiołogia, 1949, 4:39. **5.** Dzierzbicki A.: Badania bakteryologiczne gleby. Roczn. Nauk Roln. i Leśn., 1910, 5:107. **6.** Gołębiowska J. i Falkowski M.: Wpływ nawożenia na zespoły mikroflory w glebach torfowych i na ich urodzajność 1951. Praca w druku. **7.** Henkel R. A. i Butylin E. N.: O processie nitrifikacji po mietodu Waksmana w obrazcach poczw s nienaruszennoj strukturoj. Mikrobiołogia, 1935, 4:364. **8.** Krasilnikow H. A.: Wlijanie korniewych wydielenij na razwitie azotobaktiera i drugich poczwiennych mikrobow. Mikrobiołogia, 1943, 3:345. **9.** Krasilnikow H. A.: Mikrofłora rhizosfiery i jej wlijanje na urożajnost' i rost rastienii. Chimizacja ziemliedielja, 1940, 7:36. **10.** Krasilnikow H. A.: O wzaimodiejstwiji mikroorganizmow poczwy s rastienjami. Priroda, 1941, z. 3:41. **11.** Krasilnikow H. A.: Rasprostranienje i aktiwnost' azotfiksatorow. Agrobiołogia, 1947, 5:56. **12.** Kriss A. E.: Mikroorganizmy tundrowych i polarno-pustynnych poczw Arktiki. Mikrobiołogia, 1947, 16:437. **13.** Kriuczkowa A. P.: K izuczienju ekołogiczieskoj izmiencziwosti mikroorganizmow w swiazi s agronomiczieskoj diagnostikoj, Mikrobiołogia, 1934, 3:232. **14.** Miszustin E. H. i Mirzojewa W. A.: Rastitielnyje pojasa gor i ich otrażenje w sostawie baktierjalnogo nasielenja poczwy. Mikrobiołogia, 1950, 19:299. **15.** Niklewski M. Referat

dla Rady Nauk. przy Ministrze Roln. i R. R., 1949, (nie opublik.). **16.** Obrazcow A. A.: Mikroorganizmy rhizosfiery w batumskich krasnoziemiach. Dokłady Akad. Nauk Z.S.R.R. 1935, Sekc. IV. z. **1**—2:65. **17.** Ruschman G., Bartram H., i Themlitz R.: Zersetzung und Beurteilung von Humusdüngern und Komposten. Zbl. f. Bakt. II. Abt., 1941, **104**:3. **18.** Siewierin S. A.: Bakterjalnoje nasielenje nieskolkich obrazcow poczw iz dalekawo siewiera. Wiestnik Bakt. — Agron. Stancji, 1909, **15**:116. **19.** Starkey R. L.: Some influence of the development of higher plants upon the microorganisms in the soil. Soil Sci., 1929, **27**:355, 1931, **32**:367. **20.** Waksman S. A.: Principles of Soil Microbiology. London, 1931. **21.** Winogradsky S.: Microbiologie du sol. Problémes et méthodes. Masson et Cie, Paris. 1947. **22.** Ziemięcka J.: Metody mikrobiologicznego oznaczania żyznosci gleby. Roczn. Nauk Roln. i Leśn., 1929, **21**:1. **23.** Ziemięcka J.: Nowe sposoby badania mikroorganizmów rozkładających w glebie substancję organiczną. Roczn. Nauk. Rol. i Leśn., 1934, **23**:25. **24.** Ziemięcka J., Gołębiowska J., Bosak-Hauke T.: Porównanie składu mikroflory kompostów roślinnych i obornika oraz ich działania na plony roślin. Roczn. Nauk Roln., 1950, **53**:355. **25.** Vandecaveye S. C. i Katznelson H.: Microbial activities in soil. Soil Sci, 1938, **46**:57.

J. Kobus

NIEKTÓRE CECHY MORFOLOGICZNE I FIZJOLOGICZNE BAKTERII SYMBIOTYCZNYCH ROŚLIN MOTYLKOWYCH

Z Działu Mikrobiologii Rolniczej I. U. N. G. w Puławach
i z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej U. M. C. S. w Lublinie

Wpłynęło dn. 24.III.1952 r.

Wzrastające u nas zainteresowanie sprawą szczepienia roślin motylkowych bakteriami symbiotycznymi w celu podwyższenia plonu tych roślin skłoniło autora do bliższego zbadania kolekcji szczepionek puławskich. Interesujące było wyśledzenie różnic morfologicznych nie tylko między różnymi grupami *Rhizobium*, jak np. *Rh. meliloti*, czy *Rh. lupini* i in., ale również między poszczególnymi szczepami każdej z tych grup.

Znalezienie korelacji między takimi cechami, jak szybkość wzrostu, ruchliwość, stopień zakwaszenia pożywek węglowodanowych czy zdolność peptonizacji mleka i aktywność asymilacji wolnego azotu bardzo ułatwiłoby selekcjonowanie szczepów aktywnych, potrzebnych wytwórniom szczepionek.

Z badań nad morfologią bakterii symbiotycznych należy wymienić, prócz klasycznych prac Beijerincka (1888) i Prażmowskiego (1890), publikacje Bawley i Hutchinsona (1920), Thorntona i Gangulee (1926) oraz Śnieszki (1928), którzy zbadali cykl rozwojowy *Rhizobium*.

Lewis (1938) zajmując się cytologią komórek *Rh. lupini*, *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum* i *Rh. japonicum* stwierdził, że młode komórki występują w postaci pałeczek silnie barwiących się barwikami anilinowymi i że po 24 — 48 godzinach hodowli pojawiają się komórki, w których obserwuje się granulację plazmy. Według tego autora spowodowane to jest zmianami chemicznymi w składzie plazmy komórki i nie jest związane z cyklem rozwojowym.

Löhnis i Hansen (1921) obserwowali urzęsienie u poszczególnych gatunków bakterii brodawkowych. Stwierdzili, że bakterie soi,

grochu i bobu są urzęsione monotrichalnie, natomiast koniczyny, lucerny, wyki i fasoli — peritrichalnie.

Burris i Wilson (1939) podają, że różnice w nasileniu fermentacji dla poszczególnych gatunków *Rhizobium* nie są znaczne, zaznaczają się wyraźnie tylko pomiędzy grupą wolno i szybko rosnących bakterii. Wilson i Sarles (1939) oraz Kleczkowska, Nutman i Bond (1944) stwierdzili jednak, że podział *Rhizobium* na gatunki „wolno rosnące" i „szybko rosnące" nie jest właściwy, gdyż tempo wzrostu nie jest cechą stałą, ale ulega zmianie w zależności od podłoża i od czasu trwania hodowli.

Asō i Murai (1926) stwierdzili, że bakterie łubinu i seradeli alkalizują podłoże przy fermentacji niektórych cukrów.

Studia nad rozkładem żelatyny, prowadzone w r. 1898 przez Fremlina (1898) wykazały, że bakterie łubinu rozpuszczają ją bardzo powoli. Badania te zostały potwierdzone przez Müllera i Stappa (1925) oraz Hofera i Baldwina (1932). Stwierdzili oni nadto, że bakterie grochu, wyki, fasoli, nostrzyku, lucerny i koniczyny rozpuszczają żelatynę silniej niż bakterie soi i łubinu.

Löhnis i Hansen (1921) badali zachowanie się *Rhizobium* na mleku. W wyniku swoich badań podzielili te bakterie na dwie grupy: 1) strącające kazeinę — tu należą bakterie lucerny, koniczyny, wyki, grochu i łubinu, 2) nie strącające kazeiny — tu zostały zaliczone bakterie soi, a wg Müllera i Stappa także bakterie seradeli i łubinu alkalizujące mleko.

Stevens (1925), Wright (1925) i Pohlman (1931) stwierdzili dużą wytrzymałość *Rhizobium* na wysokie stężenie fioletu krystalicznego. Badacze ci doszli do wniosku, że bakterie te mogą się rozwijać w środowisku zawierającym ten barwik w stężeniu od 1:5 000 do 1:100 000. Na podstawie tego Allen i Baldwin (1931) oraz Bystryj (1941) przeprowadzili próby izolowania *Rhizobium* z gleby na pożywce zawierającej fiolet krystaliczny w rozcieńczeniu 1:80 000.

BADANIA WŁASNE

Badania niniejsze objęły tylko niektóre cechy morfologiczne i fizjologiczne *Rhizobium*, a mianowicie: wymiary i ruchliwość komórek, zgranulowanie plazmy, rodzaj wytwarzanych kolonii, produkcję kwasów, zdolność rozpuszczania żelatyny, zdolność peptonizacji mleka i stopień odporności na fiolet krystaliczny. Przy ocenie siły asymilacji poszczególnych szczepów oparto się na wynikach doświadczeń wegetacyjnych uprzednio przeprowadzonych w Dziale Mikrobiologii Rolniczej w Puławach (p. tabl. II).

OPIS ZBADANEGO MATERIAŁU I METOD PRACY

Do badań użyto 25 szczepów bakterii symbiotycznych rożnych roślin motylkowych (tabl. I). Szczepy te otrzymano z kolekcji Działu Mikrobiologii Rolniczej w Puławach.

Badania morfologiczne przeprowadzono na pożywce Thorntona o składzie: agaru — 13 g, mannitolu — 10,0 g, K_2HPO_4 — 1,0 g, Mg $SO_4.7\ H_2O$ — 0,2 g, $CaCl_2$ — 0,1 g, NaCl — 0,1 g, $FeSO_4$ — 0·02 g, $MnSO_4$ — ślady, wody drożdżowej — 100,0 ml, wody wodociągowej do 1000 ml, pH 7.0. Obserwacje nad wymiarami komórek robiono po 48-godzinnej inkubacji w temperaturze 28° na pożywce agarowej. Preparaty bakterii utrwalano alkoholem 96% i barwiono w ciągu 1 minuty fuksyną fenolową. Obserwacje przeprowadzono w trzech kolejno po sobie następujących hodowlach. Pomiary wykonywano przy powiększeniu 1200-krotnym. Dla każdego szczepu zmierzono po około 60 komórek.

Granulację plazmy komórek badano w 3-dniowej hodowli na powyższej pożywce robiąc taką samą ilość obserwacji w kolejnych hodowlach. Preparaty mazane po utrwaleniu alkoholem barwiono w ciągu 20 minut erytrozyną fenolową (1 g erytrozyny „Grübler", na 100 ml 5% roztworu fenolu). Po spłukaniu wodą dobarwiano je fioletem goryczkowym (10 ml nasyconego alkoholowego roztworu fioletu goryczkowego „Grübler" i 100 ml 5% roztworu fenolu). Zgranulowanie plazmy określono jako słabe, średnie i silne.

Rodzaj wytwarzanych kolonii i szybkość wzrostu badano na płytkach Petriego i na agarze skośnym z pożywką Thorntona. Obserwacje prowadzono w trzech kolejnych hodowlach i w dwóch równoległych powtórzeniach dla każdego szczepu. Spostrzeżenia notowano po 24, 48 i 72 godzinach. Do bakterii szybko rosnących zaliczano te, które dały wzrost widoczny okiem nieuzbrojonym po 24 godzinach, a do wolno rosnących — dające wzrost po 48 godzinach hodowli w 28°.

Ruchliwość komórek obserwowano w kropli wiszącej w komorze Lindnera biorąc w tym celu 24-godzinny wzrost bakterii z pożywki płynnej Thorntona w 28°. Stopień ruchliwości bakterii określano tylko orientacyjnie. Przyjęto przy tym, że najwyższy stopień ruchliwości miał szczep nr 1 izolowany z fasoli; drugi kraniec skali porównawczej stanowił b. słabo ruchliwy szczep nr 1, izolowany z bobu. Przy zbadaniu trzech kolejnych przeszczepień ustalono następującą skalę: ruchliwość b. silna, silna, średnia, słaba, b. słaba.

Badania nad zdolnością wytwarzania przez *Rhizobium* kwasów z poszczególnych cukrów i alkoholi przeprowadzono na pożywce płynnej z glukozą, fruktozą, galaktozą, sacharozą, maltozą, laktozą i z mannitolem (f-my Kahlbaum). Początkowy odczyn pożywki, ustalony na pH 7,5, częściowo obniżył się w trakcie wyjaławiania. (pH pożywek po wyjałowieniu: z glukozą — 7.1; z fruktozą — 7.1; z galaktozą — 7,1; z sacharozą — 7,5; z maltozą — 7,3; z laktozą — 7,3; z mannitolem — 7,5). Do badań odczynu użyto błękitu bromo-tymolowego (Grübler) dodawanego wprost do pożywki (5 ml 0,5% roztworu alkoholowego na 1 litr pożywki). Temperatura hodowli 28°. Hodowle prowadzono w 2 równoległych powtórzeniach dla każdego szczepu. Zdolność wytwarzania kwasów zbadano tylko w jednym przeszczepieniu. Obserwacji nad zmianami odczynu dokonywano w ciągu 7 dni, a w ciągu następnego tygodnia co drugi dzień. Kolejne zmiany pH w hodowlach notowano posługując się skalą Clarka.

Stopień rozpuszczania żelatyny badano w trzech powtórzeniach na pożywce o składzie: żelatyna 60,0 g, mannitol 10,0 g, woda wodociągowa 1000 ml, pH 7.0,

w 15—18° przez okres 6 tygodni. Obserwacje notowano co 3 dni. Skalę porównawczą zdolności rozpuszczania żelatyny ustalono na podstawie porównań grubości warstwy rozpuszczonej przez różne szczepy w ciągu okresu trwania hodowli.

Zdolność peptonizacji mleka badano na mleku odtłuszczonym. Obserwacje prowadzono po 1, 2, 3, 4, i 6 tygodniach w dwóch powtórzeniach równoległych. Stopień speptonizowania mleka oznaczono umownie uwzględniając ilość (wysokość słupa) nie strawionej kazeiny.

W celu stwierdzenia stopnia wytrzymałości na fiolet krystaliczny przeprowadzono badania na płytkach Petriego na agarowej pożywce Thorntona z dodatkiem fioletu krystalicznego w stężeniu od 1:200 000 do 1:1 000. Obserwacje mikroskopowe i makroskopowe robiono po 24, 48, 72 i 120 godzinach hodowli w 28°. Stosowano 5 powtórzeń równoległych dla każdego szczepu; większej ilości przeszczepień nie badano.

Opis poszczególnych szczepów

Rozmiary komórek, zachowanie się szczepów na mleku, żelatynie, pożywce z fioletem krystalicznym oraz ich oddziaływanie na węglowodany ujęto w tabl. I.

1. *Rh. meliloti* — z lucerny *(Medicago sativa)*, szczepy „B" i „Th": Kolonie na agarze nieznacznie wzniesione, błyszczące i nie przezroczyste, koloru kremowego, konsystencji masłowatej, nieciągliwej.

Szybkość wzrostu duża; kolonie widoczne gołym okiem po 24 godzinach. Zgranulowanie plazmy słabe.

Ruchliwość u szczepu „B" — słaba, u szczepu „T" — silna.

Różnice szczepowe stwierdzono zatem tylko w ruchliwości komórek. Szczep „Th" nieco słabiej zakwaszał niektóre cukry i był trochę bardziej wrażliwy na fiolet krystaliczny (tabl. I.)

2. *Rh. trifolii* — z koniczyny *(Trifolium repens)*. Kolonie na agarze: przezroczyste, z czasem mętniejące i białe, o konsystencji słabo kleistej.

Szybkość wzrostu duża (24 godziny).

Szczep „2" zgranulowanie plazmy słabe, ruchliwość silna;
„ „4" „ „ średnie, „ słaba;
„ „F" „ „ średnie, „ silna;
„ „N" „ „ średnie, „ słaba.

W obrębie tego gatunku wystąpiły więc różnice szczepowe pod względem wielkości komórek, ich ruchliwości, wytwarzania kwasów, zdolności do peptonizacji mleka, stopnia rozpuszczania żelatyny i wytrzymałości na fiolet krystaliczny (tabl. I).

3. *Rh. leguminosarum:*

a) z grochu *(Pisum sativum)* — szczepy nr 1, 3 i 5.

Kolonie na agarze: znacznie wzniesione, półprzezroczyste, białawe, błyszczące, konsystencja śluzowata, ciągliwa. Kolonie z silną tendencją

do rozprzestrzeniania się. Szybkość wzrostu duża (po 24 godzinach). Zgranulowanie plazmy średnie. Ruchliwość silna.

W grupie tej odrębności szczepowe wykazał tylko szczep nr 1, odznaczający się drobnymi wymiarami komórek (cecha utrzymująca się od wielu lat). Szczep nr 5 jest nieco mniej wytrzymały na fiolet krystaliczny niż szczepy nr 1 i 3. Jest to więc grupa bardzo jednolita.

b) z wyki *(Vicia sativa)*:

Wzrost na agarze: kolonie wzniesione, przezroczyste. Szybkość wzrostu duża (po 24 godzinach).

Szczep nr 59 zgranulowanie plazmy silne, ruchliwość silna,
„ nr. 67 „ „ średnie, „ b. silna.

W obrębie tej grupy stwierdzono jedynie nieznaczne różnice w wymiarach komórek, zgranulowaniu plazmy i w ruchliwości.

c) z bobiku *(Vicia faba minor)* — szczepy „Og i „S":

Wzrost: kolonie na agarze: wzniesione, błyszczące, półprzezroczyste i białe. Szybkość wzrostu duża (po 24 godzinach). Zgranulowanie plazmy średnie, ruchliwość silna.

Szczep „Og" zakwasza silniej pożywki z węglowodanami i jest mniej wrażliwy na fiolet krystaliczny (tabl. I) niż szczep „S".

d) z bobu *(Vicia faba vulgaris)* — szczep nr 1.

Kolonie na agarze: słabo wzniesione, błyszczące, półprzezroczyste i białe. Szybkość wzrostu duża (po 24 godzinach). Zgranulowanie plazmy silne, ruchliwość silna.

Zestawiając cechy wszystkich zbadanych szczepów *Rh. leguminosarum* stwierdzamy występowanie wybitnych różnic pomiędzy szczepami, związane z ich pochodzeniem, tj. w zależności od gatunku rośliny, z której je izolowano.

4. *Rh. phaseoli* — z fasoli *(Phaseolus vulgaris)* — szczepy nr 1, 3 i 5.

Wzrost: kolonie na agarze lekko wzniesione, konsystencji masłowatej, półprzezroczyste, błyszczące i białe. Szybkość wzrostu duża (po 24 godzinach). Zgranulowanie plazmy słabe, ruchliwość b. silna.

Gatunek ten pod względem zbadanych cech okazał się najbardziej jednorodny. Pewne różnice między szczepami zauważono tylko w stopniu peptonizacji mleka.

5. *Rh. japonicum* — z soi *(Glycine hispida)*, szczepy „94", „K" „L".

Kolonie na agarze: nieco wzniesione, nieprzezroczyste, błyszczące, białe, o konstystencji masłowatej, nieco ciągliwe. Szybkość wzrostu mała (po 48 godzinach). Zgranulowanie plazmy silne, ruchliwość słaba.

Niektóre cechy fizjologiczne bakteri

Некоторые физиологические

Some physiological

Tablica I

Gatunek	Szczep	Wyodrębniony z	Rozmiary komórek w μ	Peptonizacja mleka	Rozpuszczanie żelatyny	Wzrost prz 1 : 200000	1 : 150000
Rh. meliloti	B	*Medicago sativa*	0,5×2,0—3,0	+	++	+++	++
	Th	„	0,5×1,5—3,0	+	+++	++	++
Rh. trifolii	2	*Trifolium repens*	0,6×1,5—2,0	+++	+++	++	+
	4	„	0,4×1,5—2,6	+++	±	++	+
	F	„	0,5×1,9—2,6	+	++	++	++
	N	„	0,5×1,6—2,3	+	+++	++	+
Rh. leguminosarum	1	*Pisum sativum*	0,4×0,75—1,5	++++	+++	+++	++
	3	„	0,5×1,5-12,0	++++	+++	+++	++
	5	„	0,5×1,5—2,5	+++	++++	+++	++
	59	*Vicia sativa*	0,6×1,5—2,0	+	±	++	++
	67	„	0,6×1,6—2,2	+	±	++	++
	Og	*Vicia faba minor*	0,5×1,5—2,5	+++	++++	++	++
	S	„	0,5×1,3—2,8	+++	+++	++	++
	1	*Vicia faba vulgaris*	0,5×1,5—1,75	++	++	++	++
Rh. phaseoli	1	*Phaseolus vulgaris*	0,5×1,5—2,0	+	++	+++	++
	3	„	0,5×1,5—1,75	+	+++	+++	++
	5	„	0,5×1,5—1,8	++++	+++	+++	++
Rh. japonicum	94	*Glycine hispida*	0,6×1,8—2,8	+	+	++	±
	K	„	0,5×1,5—2,5	±	+	++	○
	L	„	0,5×1,5—2,5	±	±	++	○
Rh. lupini	Cz	*Lupinus polyphyllus*	0,5×1,5—3,0	○	+++	++	++
	4	*Ornithopus sativus*	0,6×2,2—3,0	±	++	++	○
	5	„	0,5×2,2	+	++++	++	+
	K	„	0,5×1,5—2,5	++	++	++	○
	1	*Galega officinalis*	0,5×1,8—2,2	+	+	++	○

Objaśnienia: wzrost na pożywce z dodatkiem fioletu goryczkowego: ○ brak wzros

produkcja kwasów: alk. pH > 7,5; ○ — 7,5; ± — 7,1; + — 6,8; + +

mbiotycznych roślin motylkowych
изнаки *Rhizobium*
operties of *Rhizobium*

nych stężeniach fioletu krystalicznego					Zdolność zakwaszania						
1:80000	1:50000	1:20000	1:10000	1:1000	glukoza	fruktoza	galaktoza	sacharoza	maltoza	laktoza	mannitol
++	+	+	+	+	++++	++++	+++	+++	++	+	
+	+	+	+	±	+++	+++	++	++	++	+	
					+	++	++	++	++	±	
					+	++	+	+	++	+	
+	+				+	+		++	++	±	
					+		+		++	+	
++	++	++	++	+	++	++	++	++	±		
++	++	++	++	+	++++	++++	++++	++	+		
+	+	+	+	±	+++	+++	+++	++			
	±				++		alkalizuje	+	+	+	
	+				+		alkali-zuje	++	+	+	
++	++	++	++	+	++++	++++	++++	++		±	±
+	+	±			++	±	++	+		+	±
±						+				±	
+	++	++	++	+	++++	++++	++++	++	±	±	±
+	++	++	++	++	+++	++++	++++	++	+		±
	++	++	++	+	++++	++++	++++	++	±	+	+
										+	
										±	
										±	
					alkali-zuje	±				+	
					±			+		+	±
±					++					±	
					+	±	+	±	±	±	±
					alkali-zuje		alkali-zuje	++		alkali-zuje	

: b. słaby; + słaby; ++ średni; +++ silny; ++++ bardzo silny.
,4; +++ — 6,1; ++++ — < 6,1.

Jest to gatunek dość jednolity. Na uwagę zasługuje niezdolność do zakwaszania pożywek z węglowodanami poza laktozą, oraz silne zgranulowanie plazmy.

6. *Rh. lupini*

a) z łubinu *(Lupinus polyphyllus)*, szczep „Cz".

Wzrost na agarze: kolonie wzniesione, nieprzezroczyste, białe, konsystencji śluzowatej i ciągliwej. Szybkość wzrostu mała (po 48 — 72 godzinach). Zgranulowanie plazmy silne, ruchliwość b. słaba.

b) z seradeli *(Ornithopus sativus)*.

Wzrost i szybkość wzrostu jak u szczepu poprzedniego.

Szczep nr 4: zgranulowanie plazmy — średnie, ruchliwość — silna;
„ „ 5: „ „ — silne, „ — silna;
„ „ K: „ „ — średnie, „ — silna.

W gatunku tym spotykamy więc bardzo wyraźne różnice szczepowe dotyczące, prócz typu i szybkości wzrostu na agarze, wszystkich badanych własności (tabl. I).

7. *Rhizobium sp.* — z rutwicy *(Galega officinalis)*.

Wzrost na agarze: wzniesiony, półprzezroczysty, błyszczący i biały. Szybkość wzrostu duża (po 24 godzinach). Zgranulowanie plazmy — średnie, ruchliwość — silna.

OGÓLNE OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zbadane przez nas szczepy *Rhizobium* miały wymiary komórek wahające się w granicach podanych w kluczach K r a s i l n i k o w a (1949) i B e r g e y a (1948). Wyjątek stanowi *Rh. leguminosarum*—szczep nr 1 izolowany z grochu. Szczep ten od wielu lat zachowuje bardzo drobne wymiary (0,4×0,75 — 1,5 μ) odbiegając pod tym względem od wszystkich opisów systematycznych.

Przy stosowanym przez nas barwieniu wszystkie zbadane szczepy miały wyraźną ziarnistość w komórkach. Pod względem nasilenia granulacji znaleziono różnice szczepowe w obrębie gatunków *Rh. meliloti*, *Rh. leguminosarum* i *Rh. lupini*. Stwierdzono, że słabą granulacją odznaczały się wszystkie szczepy *Rh. meliloti* i *Rh. trifolii*. Natomiast *Rh. japonicum* wyróżnia się specjalnie silną granulacją.

Do szczepów szybko rosnących zaliczono: *Rh. phaseoli*, *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum*, *Rh. meliloti* i *Rhizobium sp.* z rutwicy. Do wolno rosnących zaliczono *Rh. japonicum* i *Rh. lupini*.

Pod względem jakości wzrostu możemy podzielić zbadane bakterie na 3 grupy: 1) dające na agarze skośnym wzrost bezbarwny, przezroczysty, słabo ciągliwy — *Rh. trifolii*; 2) wzrost półprzezroczysty, biały —

Rh. phaseoli, Rh. leguminosarum i *Rhizobium sp.* z rutwicy; 3) o wzroście białawym, nieprzezroczystym, silnie gumowatym — *Rh. lupini, Rh. meliloti* i *Rh. japonicum.* W obrębie *Rh. leguminosarum* nieco odmiennym wzrostem wyróżniają się bakterie izolowane z wyki. Dają one wzrost bezbarwny, przezroczysty, natomiast szczepy *Rh. leguminosarum* wyodrębnione z innych roślin dają kolonie białawe i półprzezroczyste.

Wszystkie szczepy badanej kolekcji wykazały ruchliwość, przy czym największą ruchliwością odznaczały się bakterie z grupy *Rh. leguminosarum, Rh. phaseoli,* a także niektóre szczepy *Rh. lupini* (z seradeli), *Rh. trifolii* i *Rh. meliloti.* Natomiast szczepy *Rh. lupini* izolowane z łubinu wykazały b. słabą ruchliwość. Słaba ruchliwością odznaczały się też bakterie soi i rutwicy. Różnice w ruchliwości wystąpiły pomiędzy poszczególnymi szczepami z lucerny i koniczyny.

Pod względem wytwarzania kwasów różniły się pomiędzy sobą nie tylko poszczególne gatunki, ale i szczepy. Na ogół można by podzielić zbadane gatunki na silnie i słabo kwaszące: 1. Za stosunkowo silnie zakwaszające uznano takie *Rhizobia*, które obniżyły pH z 7.5 do < 6.1. Należą tu *Rh. phaseoli, Rh. meliloti* i *Rh. leguminosarum* izolowane z grochu lub bobiku. 2. Za słabo kwaszące uznano te, które obniżają pH najwyżej do 6,4. Tu zaliczono: *Rh. trifolii, Rh. japonicum, Rh. lupini* i *Rh. leguminosarum* izolowane z wyki i z bobu. 3. Wreszcie niektóre *Rhizobia* alkalizują podłoże z prawie wszystkimi cukrami. Tu zaliczono *Rhizobium sp.* izolowane z *Galega officinalis.* Nadto bakterie izolowane z wyki oraz łubinu mogą alkalizować pożywki z glukozą lub z galaktozą.

Jak wiadomo, *Rhizobia* rozpuszczają żelatynę w stopniu bardzo słabym. Jednakże F r e m l i n (1898) oraz M ü l l e r i S t a p p (1925) stwierdzili, że w obrębie tego rodzaju zaznaczają się pod względem zdolności proteolitycznych różnice gatunkowe. Badania nasze wykazały, że żelatynę mogą zasadniczo rozpuszczać wszystkie gatunki *Rhizobium* i że oddziaływanie na żelatynę jest cechą szczepową. Spośród zbadanych gatunków zdolnością rozpuszczania żelatyny odznaczają się, w malejącej kolejności: *Rh. phaseoli* i *Rh. leguminosarum* — szczepy izolowane z grochu i bobiku (± + + do + + + +). *Rh. lupini* (+ + do + + + +), *Rh. meliloti* i *Rh. trifolii* (+ + do + + +). wreszcie do najbardziej „słabych" pod tym względem należą bakterie rutwicy (+), *Rh. japonicum* (+ do + +) oraz szczepy *Rh. leguminosarum* izolowane z wyki (±).

Różnice szczepowe wystąpiły więc we wszystkich niemal gatunkach.

Większą lub mniejszą zdolność peptonizacji mleka mają wszystkie szczepy prócz szczepu „Cz" izolowanego z łubinu. W badanej przez nas

kolekcji stosunkowo najsilniej peptonizują mleko szczepy *Rh. leguminosarum* wyodrębnione z grochu i bobiku (+++ do+++), szczep nr 5 — z fasoli (+++) i szczepy nr 2 i 4 z koniczyny (+++). Najsłabiej — *Rh. japonicum* wyodrębnione z soi (±).

Największą wytrzymałością na fiolet krystaliczny wyróżniły się szczepy należące do gatunków *Rh. phaseoli, Rh. meliloti* i *Rh. leguminosarum*, izolowane z grochu i bobiku. Znoszą one stężenie nawet do 1:1 000. Do najbardziej wrażliwych na fiolet krystaliczny w podłożu należą gatunki *Rh. japonicum, Rhizobium* z rutwicy i niektóre szczepy *Rh. lupini*, których wzrost jest hamowany już przez stężenie 1:150 000. Różnice szczepowe zaznaczyły się bardzo wyraźnie tylko u trzech gatunków: *Rh. trifolii, Rh. leguminosarum* i *Rh. lupini.*

Tablica II

Wpływ różnych szczepów *Rhizobium* na plony zaszczepionych nimi roślin motylkowych (wg Gołębiowskiej, Puławy)

Сравнение высоты урожая с. в. и азота целых бобовых растений зараженных разными штаммами *Rhizobium*. Вегет. опыт в сосудах

Relative yield of dr. m. and of nitrogen in whole Leguminous plants inoculated with different strains of *Rhizobium* (pot experiments)

Rośliny doświadczalne	Nazwa gatunku i szczepu *Rhizobium* / Plon roślin	Względny plon całych roślin, %			Względna ilość N ogólnego w całych roślinach, w %		
		1940	1941	1942	1940	1941	1942
Trifolium repens	*Rhizobium trifolii:* szczep nr 2 z koniczyny — *Trifolium repens*	78	100	—	60,6	100	—
	„ nr 4 „ „	100	83	—	100,0	99,5	—
Pisum sativum	*Rhizobium leguminosarum:* szczep nr 1 z grochu — *Pisum sativum*	—	100	100	—	100	91
	„ nr 3 „ „	—	21	81	—	22	78
	„ nr 5 „ „	—	61	99	—	64	100
Ornithopus sativus	*Rhizobium lupini:* szczep nr 5 z seradeli — *Ornithopus sativus*	—	100	85	—	100	100
	„ nr K „ „	—	85	100	—	98	100

Tabl. II ilustruje nam wpływ niektórych szczepów z kolekcji Działu Mikrobiologii Rolniczej w Puławach na plony roślin i na zawartość

w nich azotu. Cytujemy ją na podstawie użyczonych nam danych z doświadczeń wegetacyjnych wykonanych w tym Dziale. Zestawiając wyniki tych badań nad energią wiązania wolnego azotu w symbiozie z roślinami z wynikami naszych badań nad innymi cechami tych szczepów, nie mogliśmy stwierdzić żadnej współzależności (por. tabl. II i nasze opisy cech odpowiednich szczepów *Rhizobium*). Nie wyciągamy z tego żadnych wniosków, gdyż ilość zbadanych szczepów była bardzo mała. Pracę w tym kierunku należałoby rozszerzyć.

WNIOSKI OGÓLNE

Zestawiając wyniki badań nad 25 szczepami *Rhizobium* pochodzącymi z różnych roślin i należącymi do kolekcji puławskiej stwierdzono co następuje:

1. Bakterie te wykazały dość duże zróżnicowanie pod względem zbadanych cech morfologicznych i fizjologicznych w obrębie nie tylko grup, ale i niektórych szczepów. Najbardziej jednolite były gatunki: *Rh. phaseoli*, *Rh. meliloti* i *Rh. japonicum*, a najmniej „ustabilizowane": *Rh. leguminosarum*, *Rh. trifolii* i *Rh. lupini*.

2. U wszystkich szczepów *Rhizobium* zaznaczała się wyraźnie korelacja między zdolnością do wytwarzania kwasów a odpornością na fiolet krystaliczny.

3. Stwierdzono pewną współzależność pomiędzy szybkością wzrostu, zdolnością do wytwarzania kwasów i stopniem wytrzymałości na fiolet krystaliczny (tabl. I). Mianowicie niektóre szybciej rosnące bakterie silniej zakwaszały podłoże i znosiły wyższe stężenie fioletu krystalicznego. Należą tu szczepy *Rh. phaseoli*, *Rh. meliloti* i spomiędzy szczepów *Rh. leguminosarum* te, które wyodrębniono z grochu i bobiku, w przeciwieństwie do *Rh. trifolii*, *Rh. japonicum*, *Rh. lupini*, *Rhizobium* z rutwicy oraz *Rh. leguminosarum* — szczepy z wyki i z bobu.

4. Inne cechy, jak: wymiary i kształty komórek, ich granulacja, ruchliwość oraz zdolność do rozpuszczania żelatyny i do peptonizacji mleka były różne u poszczególnych gatunków i szczepów, wzajemnej jednak korelacji między nimi nie znaleziono.

5. Porównując szybkość wzrostu, stopień zgranulowania plazmy komórek, ich ruchliwość, wzrost przy różnych stężeniach fioletu krystalicznego, zdolność fermentowania cukrów i mannitolu oraz zdolność rozpuszczania żelatyny i peptonizacji mleka z energią wiązania wolnego azotu u *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum* (z grochu) i *Rh. lupini* (z seradeli), nie znaleziono, by energia wiązania wolnego azotu łączyła się w sposób wyraźny z którąkolwiek z tych cech przez nas zbadanych. Ba-

dania te należałoby jednak powtórzyć na znacznie większym materiale doświadczalnym. Byłoby też ważne zbadanie siły oddechowej poszczególnych szczepów. Dotychczas jedynymi skutecznymi sprawdzianami aktywności różnych szczepów *Rhizobium* pod względem asymilacji azotu pozostają doświadczenia wegetacyjne.

И. Кобус

НЕКОТОРЫЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ *RHIZOBIUM*

Резюме

Автором исследованы некоторые морфологические и физиологические признаки клубеньковых бактерий. Для исследования было использовано 25 штаммов полученных из коллекции Микробиологической Лаборатории в Пулавах.

Целью этой работы является установление зависимости между способностью штаммов *Rhizobium* усваивать азот, а другими их свойствами и признаками.

Исследованые штаммы принадлежат к группам: *Rh. meliloti*, *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum*, *Rh. phaseoli*, *Rh. lupini*, *Rh. japonicum* и *Rhizobium sp.* из *Galega officinalis*. На молодых культурах (см. методика) подверглись исследованию следующие признаки: размеры, грануляция и подвижность клеток, род колонии на агаре, способность к продукции кислот из сахаров, к разжижению желатина и пептонизации молока, устойчивость против действия кристалл-виолета (табл. I). Результаты полученные автором:

1. У исследуемых штаммов не обнаружено зависимости между выше указанными признаками и способностью к усваиванию азота (см. описание штаммов и табл. II). Однако в этом отношении следовалобы провести гораздо больше опытов.

2. Самую большую устойчивость против кристалл-виолета (до 0,1%) найдено у *Rh. meliloti*, *Rh. phaseoli* и у штаммов *Rh. leguminosarum* выделенных из гороха и из *Vicia faba minor*. Меньше всего устойчивыми оказались *Rh. japonicum* и *Rh. sp.* из *Galega officinalis* (0,0007%). Найдено в этом отношении разницы между штаммами принадлежащими к *Rh. trifolii*, тоже у штаммов *Rh. lupini* и *Rh. leguminosarum*.

3. Медленно растущие *Rhizobia* — *Rh. japonicum* и *Rh. lupini* почти не дают кислот из сахаров. Особенно много кислот продуцируют быстро растущие *Rh. meliloti*, *Rh. phaseoli*, *Rh. leguminosarum* — штаммы из гороха и из *V. faba minor*. Штаммы *Rh. leguminosarum* изолированные из вики и из *V. faba vulg.* дают кислот очень мало. Штамм из *Galega officinalis* вообще алкализирует сахарные субстраты.

4. Между продукцией кислот и устойчивостью против кристалл-виолета выступает корреляция.

5. Между исследованными группами *Rhizobium* некоторые н. пр. *Rh. phaseoli* отличались как будто большей „стабильностью" признаков — все штаммы этой группы имели одинаковые свойства. Наоборот в группе *Rh. trifolii* обнаружено большую разновидность испытанных штаммов (на пример штамм нр. 2 дает кислоту из фруктозы, а шт. „N" не дает ее).

6. В группе *Rh. leguminosarum* ясно выступает влияние среды на их свойства того вида растения, из которого изолировано штаммы: штаммы полученные из *Pisum* и из *V. faba minor* были гораздо больше жизнедеятельны (продукция кислот, устойчивость к гентиане, способность к пептонизации и пр.) чем штаммы из *Vicia sativa* и из *V. faba vulg.* Все выше упомянутые результаты требуют ещё дальнейших исследований

J. Kobus

SOME MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF *RHIZOBIUM*

Summary

The ultimate aim of this study was to find out, if there exists some correlation between different characteristics of root-nodule bacteria and their N-fixation power. 25 strains derived from the Dep. of Microbiology in Puławy belonging to the groups of: *Rh. meliloti, Rh. trifolii, Rh. leguminosarum, Rh. phaseoli, Rh. lupini, Rh. japonicum* and *Rhizobium sp.* from *Galega officinalis* have been examined. The following proporties have been studied: the dimensions, granulation and motility of the cells, the kind of growth on agar, the production of acids from sugars, gelatin liquefaction, peptonisation of milk and the degree of resistance towards crystal-violet. The chief conclusions are as follows:

1. No correlation has been found between the above properties and N-fixation power (see description of strains and table II).

2. The highest resistance towards crystal-violet (up to 1:1000) has been found among the strains of *Rh. meliloti, Rh. phaseoli* and *Rh. leguminosarum* isolated from peas and from *Vicia faba minor*. On the other hand, *Rh. japonicum* and *Rhizobium sp.* from *Galega officinalis* have been specially sensible (1:150 000). In this respect there were found differences among the individual strains of *Rh. trifolii* and of *Rh. lupini* and *Rh. leguminosarum* (table I).

3. The slowly growing *Rhizobium: Rh. japonicum* and *Rh. lupini* did not produce acids from diagnostical sugars.

Especially much acid were produced by quickly growing *Rhizobium: Rh. meliloti, Rh. phaseoli* and *Rh. leguminosarum* from peas and from *V. faba minor*. Strains of *Rh. leguminosarum* derived from *Vicia sativa* and from *V. faba vulgaris* produce very little acid. A strain isolated from *Galega officinalis* gave markedly alcaline reaction in sugar media.

4. A correlation has been found between the acid production and the resistance towards crystal-violet.

5. Some of the *Rhizobium* species f. in. *Rh. phaseoli* seemed to have been uniform in their morphological and physiological properties. All strains within these species had common properties while among the strains of some other species, e. g. *Rh. trifolii*, marked differences were observed (*Rh. trifolii* strain Nr 2 produced acid from fructose in contrast to the strain „N").

6. Many variations within the species *Rh. leguminosarum* can be considered as the result of the influence of the enviroment (the host-plant tissue). Strains isolated from root-nodules of *Pisum* and of *Vicia faba minor* were much more active (production of acids, peptonisation of milk, resistance towards crystal-violet, and others) than the strains derived from *Vica sativa* or *V. faba vulgaris*.

These experiments ought to be extended.

LITERATURA

1. Allen O. N. i Baldwin I. L.: The direct isolation of *Rhizobia* from soil. J. Am. Soc. Agron., 1931, 23: 28. 2. Aso K. i Mura: U. Uber die Differenz zwischen den Reaktionen der Nährböden nach den Kulturen von Bakterien der

Leguminosenknöllchen. Conférénce Intern. de Pédologie, 3, sec. 2, 195, Rzym 1926. **3.** Bawley W. F. i Hutchinson H. B.: On the changes through which the nodule organism *(Ps. radicicola)* passes under cultural conditions. J. Agr. Sci., 1920, **10:** 144. **4.** Beijerinck M. W.: Die Bakterien der Papilionaceaen-Knöllchen. Bot. Ztg., 1888, **46:** 762. **5.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 6 ed. 1948, 223. **6.** Burris R. H. i Wilson P. W.: Respiratory enzyme systems in symbiotic nitrogen fixation. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 1939, **7:** 349. **7.** Bystryj N. F.: Wydielenje kłubienkowych bakterii iz poczwy metodom chemotaksisa. Mikrobiołogia, 1941, **10:** 247. **8.** Fremlin H. S.: Organisms in the nodules on the roots of leguminous plants. J. Path. and Bact., 1898, **5:** 389. **9.** Hofer A.W. i Baldwin I. L.: The growth of *Rhizobia* upon rich nitrogenous media. J. Bact., 1932, **23:** 66. **10.** Kleczkowska J., Nutman P. S. i Bond G.: Note on the ability of certain strains of *Rhizobia* from peas and clover to infect other host plants. J. Bact. 1944, **48:** 673. **11.** Krasilnikow N. A.: Opriedielitiel Bakterij i Aktinomycetow, Moskwa 1949, **12.** Lewis I. M.: Cell inclusions and the life cycle of *Rhizobia*. J. Bact.; 1938, **35:** 537. **13.** Löhnis F. i Hansen R.: Nodule bacteria of leguminous plants. J. Agr. Research (US), 1921, **35:** 543. **14.** Müller A. i Stapp C.: Beiträge zur Biologie der Leguminosen Knöllchenbakterien mit besonderer Berücksichtigung ihrer Artverschiedenheit. Arb. Biol. Reichsanst. Land. u. Forstw., 1925, **14:** 543. **15.** Pohlman G.: Changes produced in nitrogenous compounds by *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium japonicum*. Soil Sci, 1931, **31**: 385. **16.** Prażmowski A.: Die Wurzelknöllchen der Erbse, I: die Aetiologie und Entwicklunsgeschichte der Knöllchen, Landw. Vers. Stat., 1890, **37.** 161. **17.** Stevens I. W.: A study of various strains of *Bac. radicicola* from nodules of Alfalfa and Sweet Clover. Soil Sci., 1925. **20:** 45. **18.** Śnieszko St.: L'influence exercée par la concentration des ions d'hydrogène du milieu nutritif sur le devéloppement des bactéries des nodosités du Haricot. du Trèfle rouge, du Pois cultivé et de la Vesce velue. Bull. Acad. Polon. Sci et L., Cl. Sci. Math. et Nat., Ser. B, Sci. Nat. Bot. 1928: **55. 19.** Thornton H. G. i Gangulee N.: The life cycle of the nodule organisms *Bacillus radicicola* (Beij.) in soil and its relation to the infection of the host plant. Proc. Roy Soc., Ser. B., 1926, 99. **20.** Wilson P. W. i Sarles W. B.: Root nodule bacteria. Tabulae Biolog., 1939, **17:** 338. **21.** Wright W. H.: The nodule bacteria of Soybeans. I. Bacteriology of strains. Soil Sci., 1925, **20:** 95.

J. Supińska-Jakubowska

WYTWARZANIE ACETOINY PRZEZ *STREPTOCOCCUS DIACETILACTIS*

Z Zakładu Fizjologii Roślin i Mikrobiologii U. Ł. w Łodzi.

Wpłynęło dn. 23. I. 1952.

WSTĘP

Acetoina (acetylo-metylo-karbinol) powstaje w drobnych ilościach jako produkt metabolizmu rozpowszechnionych w przyrodzie bakterii, jak *Aerobacter aerogenes*, *Clostridium acetobutylicum* (Stephenson 1948), *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. mycoides*, *Bac. cereus*, *Bac. megatherium* (Lemoigne 1944; 1946), a także ubocznie przy fermentacji alkoholowej, octowej i propionowej w środowiskach bogatych w cukry.

Związek ten ma doniosłe znaczenie w przetwórstwie mleczarskim. Wytwarzany jest w mleku przez paciorkowce heterofermentacyjne fermentacji mlekowej.

Acetoina jest związkiem bezwonnym, ulegającym przemianie na dwuacetyl, istotny składnik aromatu masła. Utlenienie zachodzi w drodze fizykochemicznej, np. pod działaniem tlenu powietrza w wierzchniej warstwie zakwasu lub podczas wstrząsania połączonego z aeracją:

$$CH_3.CHOH.CO.CH_3 + {}^1/_2\ O_2 \longrightarrow CH_3.CO.CO.CH_3 + H_2O.$$

Dwuacetyl, czyli 2:3 - dwuketobutan jest to w stanie czystym płyn żółtozielonkawej barwy o wybitnie silnej woni, łatwo rozpuszczalny w wodzie w stosunku 1:4 przy 15°. Wrze przy 87,5—88,0° (Bömer, Juckenack i Tillmanns, 1935). Dwuacetyl w rozcieńczeniu 1:10⁶ powoduje pożądany bardzo przyjemny smak i orzechowo-migdałowy zapach masła śmietankowego. Optymalna zawartość w świeżym maśle wynosi 0.6—1.2 mg, średnio 1 mg dwuacetylu na 1 kg masła.

Począwszy od r. 1935 do lat ostatnich zagadnienie aromatu skupia zainteresowania wielu badaczy, szczególnie w krajach rolniczych o rozwiniętej produkcji maślarskiej. W Polsce badania naukowe w tym kierunku wiążą się z wykryciem nowego gatunku paciorkowców wyodrębnionych i opisanych przez Matuszewskiego, Pijanowskiego i Supińską (1936) pod nazwą *Streptococcus diacetilactis*. Nazwa ta podkre-

śla swoiste uzdolnienia fermentacyjne: bakterie te łączą w sobie pewne cechy fizjologiczne dwóch gatunków bakterii fermentacji mlekowej, mianowicie: kwaszących — *Str. lactis* (Löhnis), *Str. cremoris* (Orla-Jensen) oraz aromatyzujących — *Leuconostoc citrovorus* (Hammer) = *Str. citrovorus* vel. *Betacoccus cremoris* (Orla-Jensen).

Krasilnikow (1949) uważa *Str. diacetilactis* za odmianę *Str. lactis*, Bergey (1948) — za zbliżony do *Str. cremoris*. Mattick zalicza te gatunki do jednej grupy serologicznej N (dane nie opublikowane).

Wybitny znawca bakterii fermentacji mlekowej Orla-Jensen (1943) podkreśla istotną dla *Str. diacetilactis* właściwość powodowania zmian fermentacyjnych, które osiągano dawniej przez hodowlę symbiotyczną paciorkowców kwaszących z aromatyzującymi, co wiązało się z częstymi niepowodzeniami w praktyce mleczarskiej.

Pette (1947) wykazuje możliwości stabilizacji czynności zakwasu maślarskiego, która polega na równowadze rozwoju i działania *Str. lactis-cremoris* i *Betacoccus cremoris* przy wspólnej ich hodowli, przy czym osiąga się równowagę między kwaszeniem a wytwarzaniem aromatu. Jednakże równowaga ta łatwo może ulec zachwianiu pod wpływem takich czynników, jak temperatura hodowli, ilość wysiewu kultury wyjściowej, a przede wszystkim różnica tempa wzrostu poszczególnych gatunków, przy czym może nastąpić spadek lub całkowity zanik aromatu albo też zbyt powolny przebieg kwaszenia. Zjawiska te często obserwowane są w praktyce bakteriologicznej przy hodowli zakwasu.

Badania Matuszewskiego, Pijanowskiego i Supińskiej (1937) nad licznymi szczepami *Str. diacetilactis* wykazały stałość ich cech morfologicznych i fizjologicznych. W hodowli na mleku krowim w ciągu 18 — 24 godzin badane szczepy wytwarzały około 0,9% kwasu mlekowego prawoskrętnego a jednocześnie znaczną ilość acetoiny (do 20 mg z 50 ml hodowli oraz 0,055 — 0,072% kwasu octowego i 0,022 — 0,034% CO_2).

Wprowadzone jako stały składnik zakwasu szczepy te powodowały pożądany migdałowo-orzechowy smak masła przy znacznej zawartości dwuacetylu (około 1 mg na 1 kg).

Chemizm procesu powstawania dwuacetylu nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony. Van Beynum (1934) stwierdził, że acetoina powstaje w okresie wzrostu *Betacoccus cremoris* w środowisku kwaśnym, np. w mleku zakwaszonym kwasami organicznymi lub nieorganicznymi. Przy wspólnej hodowli paciorkowcom kwaszącym przypada rola wstępnego przygotowania środowiska dla umożliwienia rozwoju bakterii aromatyzujących.

Badania Van Beynum i Pette (1939) nad rozkładaniem kwasu cytrynowego przez *Betacoccus cremoris* potwierdziły wyniki Hammera i współpracowników dotyczące tworzenia się acetoiny razem z CO_2 i z CH_3COOH w obecności kwasu

cytrynowego. Autorzy ci układają hipotetyczny schemat fermentacji zakładając, że produktem wyjściowym jest kwas cytrynowy: poprzez kwas pirogronowy i aldehyd octowy powstaje w warunkach beztlenowych acetoina, a dalej przez utlenienie w warunkach tlenowych — dwuacetyl.

W okresie wojny światowej, w latach 1941—43, badacze fińscy kontynuowali prace nad powstawaniem aromatu. Storgaard (1942—43) stwierdził, że *Betacoccus cremoris* wytwarza najwięcej aromatu w obecności glukozy i kwasu cytrynowego. Nie wyjaśniając roli tych składników przypuszcza, że udział kwasu cytrynowego wiąże się z zagadnieniem istnienia „akceptora" wodoru.

Virtanen i Kontio (1942—43) potwierdzają to przypuszczenie otrzymując wyraźne zwiększenie ilości acetoiny przez dodanie do hodowli kwaszącej śmietanę akceptora wodoru (błękit metylenowy, chinon lub kwas nikotynowy). Już w r. 1941 Virtanen wykazał, że związki aromatu tworzą się z cukru poprzez stadium kwasu pirogronowego, przy czym uważał za konieczny udział akceptora wodoru w dalszym przebiegu procesu tworzenia acetoiny. Wytwarzanie acetoiny z glukozy przez *Aerobacter aerogenes*, przy braku kwasu cytrynowego w podłożu, potwierdza pogląd Virtanena, że kwas cytrynowy nie jest produktem wyjściowym, a jest raczej czynnikiem regulującym potencjał oksydoredukcyjny i dlatego jest niezbędny dla przebiegu reakcji. Dopiero jednak studia Krenn i Valikowej (1949) wyświetliły w znacznym stopniu chemizm tego procesu. Badacze ci ustalili kolejne stadia przemian i określili moment włączenia pochodnej kwasu cytrynowego w przypuszczalnej formie kwasu α-ketoglutarowego do procesu przemian kwasu pirogronowego (utworzonego z glukozy), co decyduje o doprowadzeniu przemian do końca, tj. o wytworzeniu acetoiny. W próbach z czterema szczepami *Leuconostoc citrovorus* wykazano, że dla wytworzenia acetoiny niezbędna jest obecność zarówno kwasu cytrynowego, jak i laktozy, którą jednakże można zastąpić maltozą, sacharozą, rafinozą, skrobią, dekstrynami, mannitolem, sorbitolem oraz oksykwasami, mlekowym lub winowym, z wyjątkiem jabłkowego. Fermentacja rozpoczyna się od wstępnego, hydrolitycznego rozszczepienia cukrów lub wielocukrów pod działaniem hydrolaz na cukry proste, glukozę lub galaktozę. Kwasu cytrynowego nie można zastąpić innym kwasem, jak mlekowy, jabłkowy, winowy, octowy i glikolowy; jest on więc składnikiem warunkującym powstawanie acetoiny.

Dodając do bulionu oddzielnie poszczególne produkty rozkładu laktozy: aldehyd glicerolowy, metyloglioksal, kwas pirogronowy lub też aldehyd octowy Krenn i Valikowa ustalili, że acetoina może się wytwarzać wyłącznie z kwasu pirogronowego lub z aldehydu octowego, a nie tworzy się z metyloglioksalu.

Dla otrzymania acetoiny przemiana metyloglioksalu w kwas pirogronowy musi odbywać się w obecności niezbędnego czynnika utleniającego. Włączenie kwasu cytrynowego do procesu fermentacyjnego w tej fazie nasuwa przypuszczenie, że działa tu produkt jego rozkładu, tj. kwas α-ketoglutarowy.

Przekształcenie związków trójwęglowych w czterowęglowe połączone jest z procesem enzymatycznym dekarboksylacji:

$$\underset{\text{kwas pirogronowy}}{CH_3.CO.COOH} \longrightarrow \uparrow \underset{\text{aldehyd octowy}}{CO_2 + CH_3CHO}$$

Aldehyd octowy jest niezbędnym produktem przejściowym przy przemianie kwasu pirogronowego, co wykazano w próbach związania go 1% dwumedonem:

$$(CH_3)_2 . C\begin{matrix} CH_2 . CO \\ CH_2 . CO \end{matrix} > CH_2 \quad \text{(1:1 dwumetylocykloheksandion 3:5).}$$

Liczni badacze uważają, że acetoina jest produktem kondensacji 2 drobin aldehydu octowego:

$$CH_3.CHO + CH_3.CHO \longrightarrow CH_3.CHOH.CO.CH_3.$$

Powstanie acetoiny drogą polimeryzacji aldehydów jest reakcją enzymatyczną. Nie jest wyjaśnione całkowicie, czy działa tu wtórnie swoista karboksylaza. Spotykamy się z przypuszczeniami działania raczej swoistego enzymu (Neuberg 1946).

Dotychczas bakterie fermentacji mlekowej *(Str. lactis)* uchodziły za pozbawione karboksylazy. Virtanen (1941) przypuszcza, że heterofermentacyjne bakterie aromatyzujące w odróżnieniu od homofermentacyjnych posiadają enzym „tworzący acetoinę", różny od karboksylazy drożdżowej.

Porter (1944) wymienia prace Green i współpracowników, w których stwierdzono, że aldehyd octowy i kwas pirogronowy ulegają kondensacji tworząc acetoinę. Kwas pirogronowy może też ulec najpierw dekarboksylacji na aldehyd octowy, który następnie kondensuje się z drugą cząsteczką kwasu pirogronowego na acetoinę wg reakcji:

$$\underset{\text{kwas pirogronowy}}{CH_3COCOOH} \longrightarrow \underset{\text{aldehyd octowy}}{CH_3CHO} + \uparrow CO_2,$$

$$CH_3CHO + CH_3COCOOH \longrightarrow CH_3CHOHCOCH_3 + CO_2$$

Dla pełnego obrazu fermentacji należałoby założyć obok powstawania kwasu octowego, acetoiny i CO_2 tworzenie się również kwasu mlekowego z metyloglioksalu lub drogą dysmutacji kwasu pirogronowego:

$$2\ CH_3COCOOH + H_2O \longrightarrow CH_3COOH + CO_2 + CH_3CHOH\ COOH$$

albo też w drodze redukcji:

$$CH_3CO\ COOH + H_2 \longrightarrow CH_3CH(OH)COOH.$$

Wreszcie mogłoby to nastąpić, zgodnie z schematem Neuberga, pod wpływem glioksalazy i glutationu (Bernhauer 1939):

$$\underset{\text{metyloglioksal}}{CH_3CO\ CHO} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{kwas mlekowy}}{CH_3CHOHCOOH}.$$

BADANIA WŁASNE

Celem niniejszej pracy jest wyjaśnienie wpływu glukozy i cytrynianu sodu na wytwarzanie acetoiny przez *Str. diacetilactis*. W doświadczeniach używałam szczepu *Str. diacetilactis* wyodrębnionego przeze mnie za pomocą zmodyfikowanej metody (Supińska-Jakubowska 1948). Stosując metodę pierwotną używano jako podłoża fermentowanej miazgi ziemniaczanej, co często wiązało się z niepowodzeniem wskutek rozwoju

obfitej i różnorodnej mikroflory. Należały do niej przede wszystkim paciorkowce kwaszące, *Str. lactis*, odmiany często powodujące pojawianie się ujemnych cech organoleptycznych: w hodowli na mleku posmak ściągająco-kwaśny („Herbsauer") lub słodowy („Malzgeschmack"). Spotkano także liczne pałeczki typu *Aer. aerogenes*. Badania produktów mleczarskich z terenu łódzkiego, otrzymanych w drodze samofermentacji (mleko zsiadłe, twaróg, świeży ser biały), wykazywały częste występowanie *Str. diacetilactis* w produktach świeżych.

Szczep wybrany do badań, oznaczony Z_{15}, nie różnił się pod względem cech fizjologicznych i morfologicznych od szczepów opisanych pierwotnie.

Główne doświadczenia prowadzone były na wodzie drożdżowej, która stanowi pełnowartościowe pod względem biologicznym podłoże dla rozwoju bakterii fermentacji mlekowej. Podłoże przygotowane było wg przepisu Zikes-Janke (1931).

1 kg świeżych prasowanych drożdży ogrzewano z 10 litrami wody w temperaturze 100° przez 2 — 3 godziny, po czym dekantowano płyn znad osadu komórek. Metodą kilkakrotnej sedymentacji, połączonej każdorazowo z wyjaławianiem, otrzymano płyn zupełnie klarowny. Gotowa do użycia woda drożdżowa miała barwę żółtozielonkawą, kwasowość 0,1° Delbrücka, c. wł. 1,005, zawartość substancji redukujących 0,142% glukozy (po hydrolizie). Glukozę i chemicznie czysty cytrynian sodu dodawano przed wyjaławianiem. Zachowano warunki wyrównane: temperatura 27,5 — 28°, wysiewy z hodowli jednodobowej *Str. diacetilactis*, szczep Z_{15}.

Metodyka oznaczeń acetoiny (i dwuacetylu). Oznaczenie wykonywano drogą utlenienia acetoiny na dwuacetyl (Bömer, 1935): 50 ml hodowli plus 50 ml 20% $FeCl_3$ destylowano powoli (około 50 min.) przez chłodnicę Liebiga. W destylacie zebranym w ilości 10 ml oznaczono zawartość dwuacetylu:

a) metodą kolorymetryczną: 5 ml destylatu z dodatkiem pastylki KOH (około 0,5 g) zagotowywano w próbówce. Zależnie od stężenia dwuacetylu następowała zmiana barwy. Oznaczenie kolorymetryczne wykonywano natychmiast po zagotowaniu próbki na podstawie uprzednio przygotowanej skali barw, odpowiadającej różnym stężeniom dwuacetylu (chemicznie czystego);

b) metodą chemiczną: oznaczono acetoinę wagowo wg van Niela (Bömer 1935). W destylacie oznaczano zawartość dwuacetylu w postaci osadu metyloglioksymu niklu, który strącano przez dodanie: 3 — 5 ml 20% octanu sodu, 2 ml 20% chlorowodorku hydroksylaminy oraz 1 — 2

ml 10% chlorku niklu. Drobnokrystaliczny czerwony osad, zbierany w tyglu Schotta nr G_3, po 24 godzinach przemywano gorącą wodą, po czym suszono do stałej wagi w 105 — 110°. Waga metyloglioksymu w mg x 0,596 = mg diacetylu, pomnożona przez 0,610 = mg acetoiny.

Próba wstępna polegała na porównaniu rodzaju fermentacji w zależności od użytych szczepów czystej hodowli trzech różnych gatunków paciorkowców aromatyzujących. Jako podłoża użyto mleka chudego lub mleka z dodatkiem 1% cytrynianiu sodu.

Wyniki fermentacji są zestawione w tabl. I.

Tablica I

Hodowla paciorkowców aromatyzujących w mleku
Культура ароматообразующих стрептококков в молоке
Culture of aroma producing streptococci in milk

Szczep bakterii	Rodzaj podłoża	Zmiany podłoża	Po 3 dniach hodowli: Kwasowość w oS.H. 2)	Po 3 dniach hodowli: Ilość acetoiny (jako sól niklowa) w mg na 100 ml hodowli
Str. diacetilactis szczep Z_{15}	mleko samo	po 24 godz. skrzep galaretowaty, słabe gazowanie,	45.0	11,4
	„ +1% CS[1])	po 24 godz. skrzep jak wyżej z serwatką, silne gazowanie	45,0	113,3
Str. citrophilus szczep nr 21	mleko samo	po 3 dniach skrzep galaretowaty, słabe gazowanie	42.0	7,2
	„ + 1% CS	po 3 dniach skrzep galaretowaty, słabe gazowanie, rozpuszczanie sernika	42,0	106,5
Str. citrovorus szczep nr 2	mleko samo	po 3 dn. rozwój prawidłowy, skrzepu brak	17,0	0
	„ + 1% CS	j. w.	24.0	0

1) CS = cytrynian sodowy

2) 1° Soxhlet—Henkela odpowiada 1 ml n/4 NaOH użytego do zobojętnienia 100 ml badanego płynu.

Wstępna próba wykazała różnice w szybkości rozwoju i w intensywności kwaszenia u poszczególnych szczepów. Przy najwyższym stopniu kwaszenia *Str. diacetilactis* wytwarzał najwięcej acetoiny reagując przy tym silnie na dodatek 1% cytrynianiu sodu. Analogicznie zachował się szczep *Str. citrophilus* nr 21, który rozwijał się jednak wolniej, powodował skrzepnięcie mleka dopiero po 3 dniach. Szczep ten po-

chodził z Holandii; opisany jest przez Van Beynuma i Pette'go (1936), jako zdolny do kwaszenia i do produkcji aromatu, jednakże wytwarzający niepożądany zapach w mleku.

Porównawczą hodowlę w wodzie drożdżowej *Str. citrophilus* nr 21 i *Str. diacetilactis* Z_{15} ilustruje tablica II.

Tablica II

Hodowla porównawcza *Str. diacetilactis* i *Str. citrophilus;* 4 dni.
Сравнительная культура *Str. diacetilactis* и *Str. citrophilus;* 4 дня
Culture of *Str. diacetilactis* and *Str. citrophilus;* 4 days.

Szczep	Podłoże	Obserwacje rozwoju	Kwasowość w oDelbrücka	pH	Ilość acetoiny (kolorymetrycznie) w mg na 100 ml hodowli
Str. citrophilus szczep nr 21	Woda drożdżowa + 2% glukozy + 4% cytr. sodu	męt śluzowaty osiadający na dnie łańcuszki i liczne formy inwolucyjne; brak gazowania.	—	—	0
Str. diacetilactis szczep Z_{15}	„ „	Po 48 godz. gazowanie silne, po 4 dn. gaz słabszy, męt śluzowaty	0,30	6,0	255,8
Str. citrophilus szczep nr 21	Woda drożdżowa + 0,5% glukozy + 1% cytrynianu sodu	po 24 godz. gaz. silne, postać: normalne dwojniaki i łańcuszki do 12 komórek	0.25	5,0	25,6
Str. diacetilactis	„ „	po 24 godz. gaz. silne, postać normalna	0,25	6,0	51,2

Jak widzimy, *Str. diacetilactis* wykazał intensywny wzrost przy różnych dawkach cytrynianu sodu i glukozy dając przy 2% glukozy i 4% cytrynianu sodu obfity wzrost z oznakami gazowania oraz wytwarzając acetoinę w ilości do 255.8 mg. *Str. citrophilus* zaś w tych warunkach rozwijał się słabo i nie wytwarzał acetoiny.

Dalsze badania polegały na stwierdzeniu wpływu różnych dawek glukozy i cytrynianu sodu na rozwój *Str. diacetilactis* i na tworzenie przezeń acetoiny.

W 40 doświadczeniach przeprowadzonych w 7 seriach obserwowano makroskopowe oznaki rozwoju notując zmiany morfologiczne i oznacza-

jąc kwasowość ogólną (miareczkowo n 10 NaOH wobec fenolftaleiny) wyrażoną w ° Delbrücka, pH podłoża (przy użyciu wskaźnika uniwersalnego) i zawartość acetoiny w destylacie (kolorymetrycznie).

Wyniki zestawione zostały oddzielnie dla każdej serii odpowiadającej różnym stężeniom dodawanych składników: glukozy i cytrynianiu sodu. Wyniki przedstawia tabl. III.

Tablica III

Wpływ różnych dawek cytrynianu sodu i glukozy na rozwój *Str. diacetilactis* i na wytwarzanie acetoiny

Влияние различных концентраций лимоннокислого натрия и глюкозы на рост *Str. diacetilactis* и на образование ацетоина

Influence of sodium citrate and glucose on growth and acetoin production by *Str. diacetilactis*

Woda drożdż. z dodatkiem		Rozwój *Str. diacetilactis*	pH	Kwasowość w °Delbr.	Ilość dwuacetylu w 100 ml pożywki (hodowli) mg	Uwagi
glukozy %	cytr. sodu %					
0,5	0,5	rozwój normalny, dwojniaki i łańcuszki	5,0	—	25,0	Hodowla
0,5	1,0	j. w., po 24 godz. gazowanie +	6,0	—	50,0	4 dni „
0,5	1,5	j. w., po 24 godz. gazowanie ++	8,0	—	75,0	„
0,5	2,0	j. w., po 24 godz. gazowanie +	8,0	—	nieoznacz.	„
0,5	3,0	komórki okrągłe powiększone, łańcuszki długie do 10 komórek, gaz. + +	8,5	—	120,0	„
0,5	4,0	liczne formy inwolucyjne, aglutynacja komórek, po 24 godz. gaz. +	8,5	—	120,0	„
0,5	5,0	j. w., osad śluzowaty,	8,5	—	120,0	„
1,0	0,5	normalny, gaz. +	4,8	—	15,0	3 dni
1,0	1,0	j. w. gaz. ++	5,0	—	35,5	„
1,0	2,0	j. w. gaz. +++ dłuższe łańcuszki do 12 komórek	6,0	—	100,0	„
1,0	5,0	męt śluzowaty, długie łańcuszki, formy inwolucyjne, gaz. +	7,0	—	150,0	
1,0	7,5	słaby rozwój	6,0	—	60,0	6 dni
1,0	10,0	brak rozwoju	6,0	—	—	„

c. d. tab. III.

Woda drożdż. z dodatkiem		Rozwój *Str. diacetilactis*	pH	Kwasowość w °Delbr.	Ilość dwuacetylu w 100 ml pożywki (hodowli) mg	Uwagi
glukozy %	cytr. sodu %					
2,0	0,5	rozwój normalny, gaz. +	4.0	0,8	15.0	3 dni
2,0	0,5	j. w.	4.5	0,8	37,5	„
2.0	1.0	j. w.	5,0	0.9	75,0	„
2.0	1,5	j. w.	5,0	0,9	100.0	„
2,5	0,5	rozwój normalny, gaz. ±	4,8	0.75	30,0	7 dni
2,5	1,0	j. w., gaz. ++	5,0	0.85	75,0	„
2,5	2.0	gaz. ++, po 3 dniach +++	5,2	0,85	140,0	„
2,5	3,0	po 24 godz. gaz. ++,				
		po 3 dniach +++,	5,2	0.85	160,0	„
2.5	4,0	po 24 godz. gaz. +++,				
		po 3 dniach +++,	6.0	0,40	200.0	„
2.5	6,0	po 24 godz. gaz. —				
		po 3 dniach +,	6,9	0.30	160,0	„
2,5	7,0	po 24 godz. gaz. —,				
		po 3 dniach gaz. —,	6,8	0,30	100,0	„
2,5	7,5	j. w.	6,8	0,30	80,0	„
2.5	6,0	męt śluzowaty na dnie,				
		po 24 godz. gaz. —,			wagowo	
		po 3 dniach gaz. +,	6.8	0,30	236,8	„
2,5	7,0	j. w., po 3 dniach gaz —,	6,8	0,25	133,8	„
2,5	7.5	j. w.	6,8	0,25	107,3	„

Oznaczenia: gazowanie: + słabe, +++ silne, — brak.

Wyniki doświadczeń ilustrują wykresy 1 — 3. Wykres pierwszy przedstawia wzrost ilości acetoiny (przeliczony na mg dwucetylu) w miarę wzrostu dawek glukozy. Dla poszczególnych stężeń glukozy zaznacza się wyraźnie pewne maksimum produkcji acetoiny, zależne od dawki cytrynianu. W każdej serii otrzymano maksimum, które wskazuje na współzależność między tymi składnikami. Przy pewnym stężeniu optymalnym obu składników wzrost komórek i intensywność fermentacji nie ulegają zaburzeniom. Wykres 2 podaje wzrost ilości acetoiny przy wzrastających stężeniach cytrynianu. Maksimum wytwarzania acetoiny (dwuacetylu) zależy wyraźnie od ilości glukozy. Najwyższa wartość wynosi 400 mg dwuacetylu w 100 ml hodowli przy zawartości 5% cytrynianu sodu i 2,5% glukozy.

Tablica IV

Wpływ różnych dawek glukozy przy stałej dawce cytrynianu sodu = 2% na rozwój *Str. diacetilactis* i wytwarzanie acetoiny; — hodowla 3 dni

Влияние различных концентраций глюкозы при одинаковой (2%) концентрации лимоннокислого натрия на рост *Str. diacetilactis* и на образование им ацетоина; 3 дня

Influence of glucose on growth and acetoin production by *Str. diacetilactis*, the concentration of sodium citrate being constant (2%), 3 days

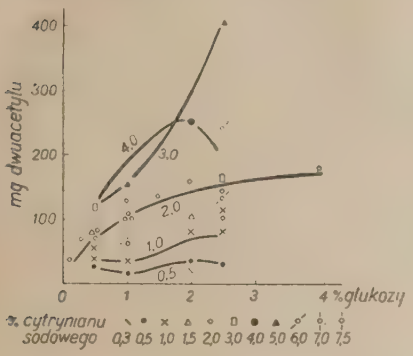
Woda drożdż. z dodatkiem glukozy %	Rozwój *Str. diacetilactis*	pH	Ilość dwuacetylu w mg na 100 ml pożywki
0	komórki drobne, silnie łamiące światło, gaz. —	7,8	kolorymetr. 0
0,1	komórki drobne, gaz. —,	8,0	35,0
0.5	komórki drobne, gaz. +,	9,5	75,0
1.0	komórki normalne, gaz. ++	6,0	150.0
2.0	komórki znacznie powiększone, liczne łańcuszki, gaz. +++,	5,0	160.0
4,0	j. w.	5,0	175,0
2,0	po 48 godz. gaz. +++	5,0	wagowo nieoznacz.
1,5	j. w.	5.0	129,9
1,0	j. w.	5.5	100,1
0,5	po 3 dniach gaz. —,	8,0	70,0
0,3	j. w.	8.0	67.1

W tablicy IV zestawiono wyniki fermentacji przy zastosowaniu 2% cytrynianu sodu i różnych dawek glukozy.

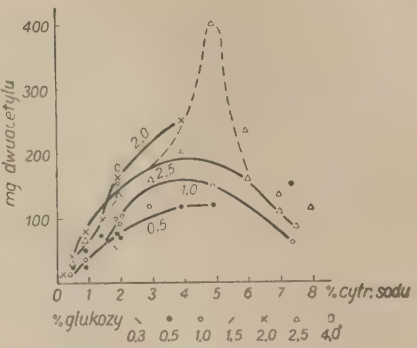
Układ punktów doświadczalnych, które odpowiadają poszczególnym dawkom cytrynianu sodu na wykresie 1, a glukozy — na wykresie 2, wyznacza przybliżony bieg krzywych. Krzywe dla przejrzystości zaopatrzono liczbami właściwymi dla odpowiednich dawek tych składników.

Dla jaśniejszego przedstawienia współzależności między ilością wytworzonej acetoiny (dwuacetylu) a ilością dwóch składników dodawanych do podłoża (glukoza i cytrynian sodu) sporządzono plan warstwicowy (wykres 3) z uwzględnieniem wszystkich punktów doświadczalnych. Krzywe odpowiadające poszczególnym wartościom wytworzonego dwuacetylu otrzymano drogą graficznej interpolacji punktów, którym odpowiadają prawdopodobnie jednakowe ilości wytworzonego dwuacetylu. Dla ilustracji umieszczono na wykresie dane otrzymane z 46 do-

świadczeń. Układ krzywych uwydatnia prawdopodobieństwo istnienia biologicznego optimum dla wartości: cytrynianu sodu w granicach 3,5 — 5,0% i glukozy — 1,5 — 3,0%, tak że bezwzględne maksimum (400 mg) leży w obszarze centralnym.

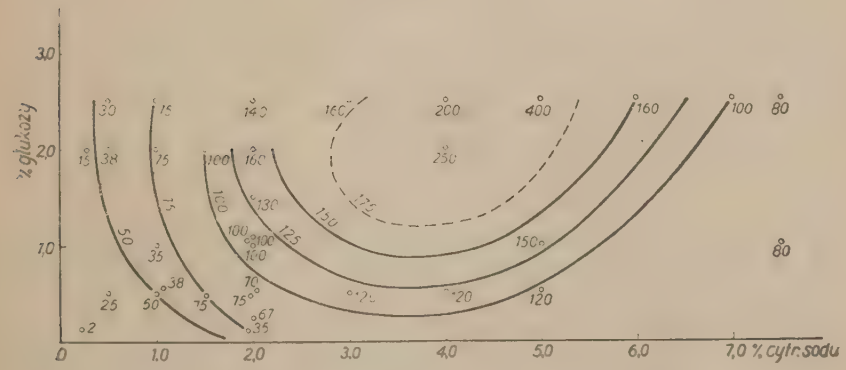


Rys. 1.



Rys. 2.

Raptowny spadek krzywej (wykres 2) może się wiązać z tym, że stężenie leży blisko biologicznej granicy dopuszczalnego stężenia. Przekroczenie tej granicy (dla cytrynianu sodu powyżej 6% a dla glukozy po-



Rys. 3.

Rys. 1, 2 i 3. Zależność ilości wytworzonej acetoiny od zawartości glukozy i cytrynianu sodu w pożywce

Зависимость количества ацетоина от концентрации глюкозы и лимоннокислого натрия в питательной среде

The effect of the concentrations of glucose and sodium citrate on the amount of acetoine in the culture of *Str. diacetilactis*

wyżej 2,5%) powoduje zahamowanie wzrostu bakterii, zmiany morfologiczne (śluzowatość, formy inwolucyjne) i osłabienie fermentacji (brak gazowania, mała ilość acetoiny), choć wartości pH i ogólna kwasowość silnie zbuforowanego środowiska leżą w granicach normalnego rozwoju i fermentacji.

W jednej serii prób przeprowadzono hodowlę *Str. diacetilactis* w wodzie drożdżowej ze wzrastającymi dawkami zarówno glukozy, jak i cytrynianu sodu, przy zachowaniu stałego stosunku ich stężeń 1 : 2. Wyniki zestawione są w tabl. V oraz na wykresie 4.

Tablica V

Rozwój *Str. diacetilactis* i wytwarzanie acetoiny przy stosunku stężeń glukozy i cytrynianu sodu = 1 : 2; hodowla 6 dni.

Рост *Str. diacetilactis* и образование ацетоина при соотношении концентрации глюкозы к концентрации лимоннокислого натрия равном 1 : 2; 6 дней

Growth and acetoin production by *Str. diacetilactis* at a concentration ratio of glucose and sodium citrate = 1 : 2; culture 6 days

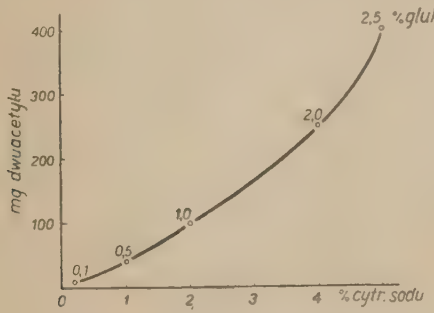
Woda drożdż. z dodatkiem		Rozwój	pH	Ilość dwuacetylu na 100 ml hodowli (kolorymetrycznie) mg
glukozy %	cytr. sodu %			
0,1	0,2	drobne dwojniaki i łańcuszki do 4 komórek	5,8	2,0
0,5	1.0	gaz. —, j. w.	5,8	37,5
1.0	2,0	gaz.+, komórki większe, okrągłe, dłuższe łańcuszki	6,0	100,0
2,0	4,0	gaz.++, osad śluzowaty, formy inwolucyjne	6.0	250.0
2,5	5,0	j. w.	7,5	400.0

Doświadczalne punkty na wykresie 4 tworzą regularny łuk krzywej (prawidłowo wzrastająca ilość dwuacetylu w miarę wzrostu stężenia obu dodawanych składników).

Według danych uwidocznionych na wykresie 3, stężeniu cytrynianu sodowego 4% a glukozy 2% odpowiada 250 mg wytworzonego dwuacetylu; stanowi to „nasycenie ekonomiczne" gdyż podwyższenie stężenia glukozy do 2,5% przy tym samym stężeniu cytrynianu, tj. 4%, obniża ilość dwuacetylu do 200 mg, równoczesna zaś podwyżka stężeń obu tych składników, tj. glukozy do 2.5% a cytrynianu do 5% daje bezwzględne maksimum dwuacetylu, tj. 400 mg. Maksimum to tworzy szczytowy punkt

krzywej na wykresie 4 i — jak zaznaczyłam — leży w obszarze centralnym planu warstwicowego, toteż jako element procesu ciągłego nie zostało wykluczone w tych rozważaniach, pomimo że odnosi się do warunków już nienormalnego wzrostu (jak wynika z uwag tabl. V).

Badane bakterie rozwijały się w szerokim zasięgu pH w środowiskach od kwaśnego (pH 4,0) do alkalicznego (pH 8,5). Jednakże na ogół alkalizacja podłoża wyższymi dawkami cytrynianu sodu przy stosunkowo mniejszych dawkach glukozy wywierała wpływ hamujący na wzrost, co objawiało się słabymi oznakami gazowania lub ich brakiem i zmianami morfologicznymi, jak tworzeniem form involucyjnych, śluzowatością zawiesiny bakteryjnej. Komórki były wówczas powiększone, bardziej kuliste, o plazmie szarawej i słabo zaznaczonej błonie.



Zależność wytwarzania acetoiny od zawartości glukozy i cytrynianu przy zachowaniu stosunku ich stężeń = 1 : 2.

Количество образованного ацетоина при соотношении концентрации глюкозы к концентрации лим. натрия равном 1:2

The effect of amount of glucose and sodium citrate by concentration ratio = 1 : 2 on the amount of acetoine.

W tabl. VI zestawiono wyniki doświadczenia, w którym glukozę zastąpiono 0,5% kwasem mlekowym. W próbie bez cytrynianu sodu nie było wzrostu, co może wiązać się ze zbyt silnym zakwaszeniem środowiska, do pH 3,5; natomiast przy dodaniu kwasu mlekowego i 2% cytrynianu sodu otrzymano wyniki dodatnie: wyraźne oznaki fermentacji z wytwarzaniem acetoiny. Podwojenie dawki cytrynianu nie wywarło wpływu na ilość acetoiny. Rzecz charakterystyczna, że otrzymana ilość 80 — 90 mg acetoiny jest bliska ilości otrzymywanej przy dawce 1% glukozy. Nasuwa to przypuszczenie, że około 50% glukozy przy fermentacji może ulegać przemianie na kwas mlekowy. Porównawczy wysiew na wodę droż-

dżową z 2% glukozy oraz z samym cytrynianem sodu w ilości 2% wykazał, że obecność obu tych składników jest niezbędna dla wytwarzania acetoiny.

Tablica VI

Wpływ kwasu mlekowego na wytwarzanie acetoiny przez *Str. diacetilactis;* hodowla 3 dni

Влияние молочной кислоты на образование ацетоина *Str. diacetilactis;* культура — 3 дня

Influence of lactic acid on production of acetoin by *Str. diacetilactis;* culture 3 days

Woda drożdżowa	Rozwój	pH	Ilość acetoiny w 100 ml hodowli, mg
bez dodatku	dobry	5,5	0
z 2% glukozy	„	4,5	0
„ 2% cytrynianu sodu	„	6,2	ślady
„ 2% glukozy i 2% cytr. sodu	„	5,0	160,0
„ 0,5% kwasu mlekowego	brak	3,5	—
„ 0,5% kwasu mlekow. i 2% glukozy	„	3,5	—
„ 0,5% kwasu mlekow. i 1% cytr. sodu	słaby	5,0	0
„ „ i 2% „ „	dobry	7,5	90,0
„ „ i 2% „ „	„	7,5	80,0
„ „ i 4% „ „	„	8,0	90,0

W próbie fermentacyjnej nr 1, zestawionej poniżej, stwierdzono, że ilość acetoiny wytworzonej przy silnych objawach fermentacji w ciągu 48 godzin, utrzymuje się na poziomie w ciągu 5 dni wykazując nie-

Tablica VII

Wpływ długotrwałości fermentacji na ilość acetoiny.

Próba fermentacyjna nr 1. Podłoże: 400 ml wody drożdżowej + 2% cytrynianu sodu + 2% glukozy

Влияние продолжительности ферментации на количество образованного ацетоина

Influence of the duration of fermentation on the amount of acetoin

Okres fermentacji	Oznaki fermentacji	Kwasowość w °Delbr.	pH	Ilość acetoiny	
				Soli Ni mg	mg
2 dni	silny męt., gaz. +++	0,25	—	245.6	149,8
3 dni	j. w.	0,25	—	245,6	149.8
5 dni	j. w.	0,25	—	244.8	149,3
9 dni	j. w., gaz. —	0,15	5,2	242.4	147.9
20 dni	j. w.	0,15	5,2	238.2	145,3

znaczny spadek po 9 dniach. Dopiero po 20 dniach hodowli spadek ten osiąga wartość 4,5 mg, co stanowi około 3% pierwotnej ilości acetoiny w hodowli.

Ilość CO_2 wytworzonego w 100 ml hodowli wynosiła 233,75 mg (mierzona przez pochłanianie w $Ba(OH)_2$).

Drugą próbę fermentacyjną przeprowadzono z wykonaniem następujących oznaczeń: CO_2 wagowo, substancje redukujące met. Bertranda, acetylometylokarbinol met. Van Niela, kwasowość: ogólną miareczkowo, pH potencjometrycznie, kwasy lotne z oznaczeniem kwasu octowego met. Duclaux. 400 ml wody drożdżowej z dodatkiem 2% cytrynianu sodu i 1% glukozy zaszczepiono 0,1 ml 24-godzinnej hodowli *Str. diacetilactis*, szczep Z_{15}. Próbę zamknięto czopem fermentacyjnym. Temperatura hodowli wynosiła 27,5°. Okres fermentacji 5 dni. Oznaki zewnętrzne fermentacji: po 24 godzinach bardzo silne zmętnienie, bardzo intensywne gazowanie zmniejszające się na 4 dzień fermentacji.

	dnie	1	2	3	4	5
1) straty wagowe wyniosły:	g	0,52	0,3	0,4	0,08	0,10

ogółem z 400 ml hodowli otrzymano 1,400 g CO_2

czyli na 100 ml „ „ 0,350 g CO_2

2) Zawartość substancji redukujących

przed fermentacją wynosiła: 1,14% glukozy

po fermentacji „ 0,37% „

ubytek 0,77% glukozy

3) Acetoina w mg jako sól Ni: 0,233 g, co odpowiada 0,142 g acetoiny.

4) Kwasowość:

a) ogólna — 0,6° Delbrücka

b) pH — 5,5

c) kwasy lotne ze 100 ml hodowli po zakwaszeniu 2 ml n 4 H_2SO_4 destylowano z parą wodną do obj. 1 l. Litr otrzymanego destylatu zobojętniano zużytkowując 69,76 ml n/10 $Ba(OH)_2$.

W destylacie kwasów lotnych oznaczano kwas octowy destylując bez pary wodnej metodą Duclaux. Poszczególne frakcje zobojętniano n 10 $Ba(OH)_2$ otrzymując wyniki zestawione w tabl. VIII.

Z porównania danych doświadczalnych z teoretycznymi widać, że alifatyczne kwasy lotne reprezentuje tu tylko kwas octowy. Ponieważ przy tej metodzie kwas octowy przechodzi tylko w 80% do destylatu, przeto otrzymany wynik należy pomnożyć przez 1,25.

Otrzymano średnio: 52,0 ml . 1,25 = 65,0 n 10 $Ba(OH)_2$, co odpowiada 0,39 g CH_3COOH.

Ponieważ dla zobojętnienia litra destylatu wyjściowego zużyto 69.76 ml n/10 Ba $(OH)_2$, przeto różnica 4,76 ml wynikła najwidoczniej z pozostałego po fermentacji w pożywce CO_2, co odpowiada ilości 10.5 mg CO_2.

Tablica VIII

Ilości kwasów lotnych w hodowli *Str. diacetilactis*

Количество летучих кислот в культуре *Str. diacetilactis*

Amounts of volatile acids in the culture of *Str. diacetilactis*

Destylat w ml	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
n 10 $Ba(OH)_2$ ml	3.75	7,84	12,21	16,70	21.47	26,36	31,64	37.49	43,85	51.81
1. CH_3 COOH %	7.24	15.13	23,57	32,23	41,44	50,87	61.07	72,36	84,63	99.99
n 10 $Ba(OH)_2$ ml	3,75	7.84	12,04	16.47	21.19	26,13	31.47	37,49	44,08	52,20
2. CH_3 COOH %	7.19	15,02	23.07	31,56	40,60	50.07	60.30	71,83	84.46	100,02
teoret. układ kwasów w %%										
mrówkowy	5.9	12,2	19.0	26,4	34.4	43.2	52,8	64.6	79,6	100.0
octowy	7,6	15.7	24,1	32,8	42,0	51.6	61,9	73.0	85,4	100,0
propionowy	12.1	24,0	33,3	46.2	56,8	66,7	76.2	85,0	93.0	100.0

W wyniku fermentacji otrzymuje się w sumie ze 100 ml wody drożdżowej +2% cytrynianu sodu i 1,14% glukozy, jako produkty fermentacji:

CO_2 : (0,35 + 0,0105 g)	= 0,36 %
CH_3 COOH	0,39 %
CH_3 CHOHCOCH$_3$	0,142 %
przy ubytku glukozy	0,77 %

Z powodu trudności technicznych nie oznaczono ubytku cytrynianu sodu, nie wykonano również oznaczenia kwasu mlekowego, który uległ prawdopodobnie częściowemu związaniu w postaci soli sodowej.

Otrzymane wyniki potwierdziły zdolność *Str. diacetilactis* do wytwarzania znacznych ilości acetoiny.

Dotychczas w literaturze spotkałam jedynie dane co do ilości związków aromatu w mleku. Michaelian i Hammer (1936) podają, że w ich doświadczeniach *Str. citrovorus* wytwarzał 62 mg acetoiny. W doświadczeniach polskich nad *Str. diacetilactis* przy dodatku 0,5% cytrynianu sodu do mleka otrzymaliśmy 42.8 — 50.2 mg acetoiny, bez tego dodatku zaś otrzymywano do 20 mg z 50 ml hodowli w mleku.

Badania Krenn i Valik (1949) nie zawierają zadnych wyników ilościowych.

Overby (1946) w pracy nad powstawaniem aromatu w zakwasie wykazuje, że szczep *Str. diacetilactis* powodował obniżenie zawartości kwasu cytrynowego w mleku z 1.84% do 0.79%. W tej samej pracy podaje, że zakwas złożony z różnych szczepów paciorkowców aromatyzujących po 13 godzinach fermentacji dawał maksymalną zawartość acetoiny 131,4 mg na 1 kg masła: po 24 godz. następował szybki spadek do 63, 3 mg, czyli o przeszło 50%. Zjawisko to tłumaczyć można zdolnością niektórych bakterii aromatyzujących do redukcji dwuacetylu i acetoiny.

Bang-Folke (1949) na podstawie wnikliwych wieloletnich badań nad zmiennością *Str. citrovorus* pod wpływem temperatur hodowli wyróżnia dwa typy: *aspirans* i *non aspirans*, o zmiennym kompleksie enzymatycznym. Typ *aspirans* redukuje dwuacetyl i acetylometylokarbinol na 2,3 glikol butylenowy (butandiol 2:3).

Wnioski ogólne

Na podstawie obserwacji dokonanych przeze mnie na 54 szczepach *Str. diacetilactis*, wyodrębnionych w okresie od 1935 do 1950, należy stwierdzić stałość cech fizjologicznych i morfologicznych tego gatunku bakterii. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy nad metabolizmem *Str. diacetilactis* szczep Z_{15} nasuwają następujące wnioski:

1) Dodatek do mleka cytrynianu sodu powodował znaczne zwiększenie ilości acetoiny (tabl. I).

2) *Str. diacetilactis* wytwarzał acetoinę w hodowli na wodzie drożdżowej przy jednoczesnej obecności 2 wyjściowych składników: glukozy i cytrynianu sodu (tabl. VI).

3) Próby eliminacji jednego z tych składników (tabl. VI) wykazały niezbędność obu, chociaż przez zastąpienie 1% glukozy 0.5% kwasem mlekowym otrzymano 80 — 90 mg acetoiny na 100 ml hodowli.

4) Stwierdzono, że optimum wytwarzania acetoiny zależy od stosunku między ilością glukozy a ilością cytrynianu sodowego w pożywce. W granicach stężeń 3.5 — 5% cytrynianu sodu i 1.5 — 3% glukozy wielkość tego stosunku byłaby stała (tabl. III — V i wykresy 1 — 4) i wynosiłaby 2 : 1 przy najwyższej produkcji acetoiny. Przy tym daje się zaobserwować regularność procesu wytwarzania acetoiny, której ilość dochodziła do maksimum około 400 mg na 100 ml.

5) Jako główne produkty fermentacji bakterie wytwarzały w wodzie drożdżowej zawierającej 2% cytrynianu sodu i 1% glukozy: 0.142 g acetoiny, 0,36% CO_2, 0.39% CH_3COOH w 100 ml hodowli (próba fermentacyjna 2, tabl. VIII).

6) *Str. diacetilactis* nie powodował znaczniejszej redukcji acetoiny: osiągnięte maksimum 0,150 g utrzymywało się w ciągu 5 dni bez zmian. po 20 dniach obniżało się o 4,5 mg, co wynosi około 3% (tabl. VII).

7) W grupie heterofermentatywnych bakterii fermentacji mlekowej. tzw. aromatyzujących, *Str. diacetilactis* odznacza się w porównaniu ze *Str. citrophilus*: a) dużą intensywnością fermentacji „mlekowo-acetoinowej". Wiąże się to z możnością przystosowania *Str. diacetilactis* do znacznych stężeń substratu (tabl. II, III, V), b) intensywnością procesów dekarboksylacji świadczącą o wyposażeniu komórek w energicznie działające enzymy o charakterze specyficznej karboksylazy.

Wyraźną swoistość uzdolnień fermentacyjnych *Str. diacetilactis* można by wyzyskać dla biologicznej metody otrzymywania dwuacetylu. Ze względu na przydatność dwuacetylu dla przemysłu spożywczego i chemicznego można by metodę biologiczną opracować jako tańszą i lepszą od syntetycznej, wyłącznie stosowanej.

Badania nad mechanizmem fermentacji acetoinowo-mlekowej będą przedmiotem dalszych studiów autorki.

Я. Супинска - Якубовска

ОБРАЗОВАНИЕ АЦЕТОИНА СТРЕПТОКОККОМ *DIACETILACTIS*

Резюме

Автором приводятся данные мировой литературы по вопросу химических процессов связанных с образованием ароматических субстанций под влиянием гетероферментативных молочнокислых стрептококков. *Str. diacetilactis*, относящийся к этой группе стрептококков отличается способностью к ацетоиномолочнокислой ферментации.

Этот вид стрептококка был изолирован и исследован в Польше в 1936 г. Матушевским, Пияновским и Супинской. До 1950 г. автором были изолированы дальнейшие 54 штамма *Str. diacetilactis*, которые сохраняют однородность физиологических и морфологических свойств и принадлежат к серологической группе N Лянсфильд.

Произведенные опыты по ферментации в молоке и в дрожжевой воде показали, что стрептококк *Str. diacetilactis*, способен к более интенсивному образованию ацетоина, чем *Str. citrophilus* и *Str. citrovorus* (таб. I, II).

Условием образования ацетоина является присутствие в дрожжевой воде глюкозы и лимоннокислого натрия, причем 1%-ый раствор глюкозы можно заменить 0,5%-ым раствором молочной кислоты (таб. VI).

Str. diacetilactis может развиваться при более высокой концентрации глюкозы и лимоннокислого натрия. Оптимальная концентрация находится в пределах от 3,5 до 5,0% для лим. натрия и от 1,5 до 3,0% для глюкозы (таб. III, IV, диаграммы 1–3).

Более высокая концентрация добавленных к дрожжевой воде лим. кис. натрия 6% и глюкозы 3% задерживает рост бактерий и изменяет их морфологическую структуру.

В случае, когда отношение лимоннокислого натрия и глюкозы равняется 2:1, количество ацетоина увеличивается в зависимости от концентрации этих субстанций.

В этих условиях количество ацетоина составляло 400 мг на 100 мл культурной жидкости (таб. V, диаграмма 4).

Результаты брожения в дрожжевой воде в присутствии 2%-ого раствора лим. кисл. натрия и 1%-ого раствора глюкозы *Str. diacetilactis* в 100 мл среды следующие: 0,142 г ацетоина, 0,36 г CO_2 и 0,39 г CH_3COOH. Методом фракционной дестиляции (по Дюкло) не удалось обнаружить муравьиной и пропионовой кислот (таб. VIII).

Интенсивный процесс декарбоксиляции указывает на участие в метаболизме *Str. diacetilactis* специфических энзимов, а среди них особого вида карбоксилазы.

Изучение механизма ацетоино-молочного брожения составляет предмет дальнейших работ автора.

J Supińska-Jakubowska

PRODUCTION OF ACETOIN BY *STR. DIACETILACTIS*

Summary

The author gives a survey of world literature on the problem of heterofermentative lactic acid streptococci, especially of their ability to produce aromatic compounds (glikol—butylene, acetoin, diacetyl).

Str. diacetilactis is actively producing lactic acid and acetoin. 54 strains isolated during the period of 1936—1950 were stable in their morphological and physiological characters: producing in 24 hours 0.9% dextrorotatory lactic acid, 0.04% acetoin, 0,05 — 0,07% CH_3COOH and 0,022 — 0,034% CO_2. — According to Mattick (unpublished) these strains belong to the serological group N (Lancefield).

The author proved that both, glucose and sodium citrate, were essential for the production of acetoin, however 1% glucose could be substituted by 0,5% lactic acid (table VI). *Str. diacetilactis* showed to be more active acetoin producer than *Str. citrophilus* and *Str. citrovorus* in milk with sodium citrate added, and in the yeast water (tables I, II).

The yield of acetoin increased proportionally to the concentration of sodium citrate and glucose. *Str. diacetilactis* was able to produce up to 400 mg of acetoin in 100 ml of culture (fig. 4, table V).

The biological optimum for acetoin formation was a concentration 3,5 — 5,0% of sodium citrate and 1,5 — 3.0% of glucose (fig. 1.—3, tables III, IV). From a 100 ml of culture (yeast water with 2% sodium citrate and 1% glucose) were obtained: 0.142 g acetoin, 0.36% CO_2, 0.39% CH_3COOH, (table VIII). During the fermentation the acetoin level was nearly stable, the decrease being ca 3% during 20 days of cultivation (table VII).

The author intends to continue investigations on the mechanism of acetoin—lactic acid fermentation.

LITERATURA

1. Bank — Folke: Über den Stoffwechsel von Sc. citrovorus. Arkiv för Kemi, 1949 : 33. 2. Van Beynum J.: Versl. landb. Onderz. 1934. 40:355. 3. Van Beynum J. i Pette J. W.: The decomposition of Citric Acid by Betacoccus cremoris. The Jour. of Dairy Res. 1939. 10:250. 4. Van Beynum J. i Pette J. W.: Verlagen van Landbouwkundige onderzoekingen: 1936. 42 (11) 360; 5. Bergey's Manual of

Determinative Bacteriology, Williams i Wilkins Co. Baltimore, 1948; 6. Bernhauer K.: Gärungschemisches Praktikum. Springer, Berlin 1939. 7. Bömer A,. Juckenack A., Tillmanns J.: Handb. der Lebensmittelchemie. Springer, Berlin, 1935. 8. Krasilnikow N. A.: Opredielitiel Bakterii i Aktinomycetow, Izd. Akad. Nauk ZSRR, Moskwa, 1949; 9. Krenn J., Valik D.: Untersuchungen über die Art und Weise der Bildung der Aromastoffe der Butter, XII Intern. Milchwirt. Kongress, Stockholm 1949, vol. 2; 516. 10. Lemoigne M., Crozon M.; Production simultanée d'acétylméthylcarbinol et lipide hydroxybutirique Bull. Soc. de Chimie Biol., 1946, **28**:110. 11. Lemoigne M., Delaporte B., Cruzon M.: Contribution à l'étude botanique et biochimique des bacteries du genre *Bacillus*, Annal. de l'Inst. Pasteur, 1944, **70**:224. 12. Matuszewski T., Pijanowski E., Supińska J.: *Str. diacetilactis n. sp.* i jego zastosowanie przy wyrobie masła. Roczn. Nauk Roln. i Leśnych, 1936, **36**, I. 13. Matuszewski T., Pijanowski E., Supińska J.: A new lactic *streptococcus* as a constituent of butter starters. Berlin 1937, Berichte des XI Milchw. Weltkongresses, Sekcja II, s. 80. 14. Michaelian M. B. i Hammer B. W.: Referat w Le lait, 1936, **16**:628. 15. Neuberg C.: The biochemistry of yeast, Ann Rev. of Biochem., 1946:462. 16. Orla — Jensen: The lactic acid bacteria, Kopenhaga 1943. 17. Overby A. J.: The formation of flavour in starters and butter determined by the Acetoin and Diacetyl Content, Kopenhaga, 1946. 18. Pette J. W.: The stability of butter starters. Nederlands Melk in Zuiveltidschrift (The Netherlands Milk and Dairy Journal), Amsterdam 1947. 19. Porter R.: Bacterial chemistry and physiology J. Willey, a. sons New-York 1947. 20. Stephenson M.: Bacterial metabolism. Longmans, Green a. comp., London 1948, 21. Storgaard T.: Über die Bildung von Aroma-Stoffen der Butter. Ref. Zentr. f. Bakt. A. II. 1942—43, **105**.44. 22. Supińska-Jakubowska J.: Badania nad *Str. diacetilactis*, Med. Dośw. i Społ., 1948, **25**:194. 23. Virtanen A. J., Kontio P.: Ref. w Zentr. f. Bakt. A. II. 1942—43, **105**:45. 24. Virtanen A. J.: Über die Bildung des Butteraroma bei der Rahmsäuerung. Z. f. ang. Chemie 1941, **54**:491. 25. Zikes-Janke: Mikrobiologische Arbeitsmethoden. Lipsk, 1931.

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

Warszawa, ul. Asfaltowa 11

GEODEZJA I KARTOGRAFIA (kwartalnik)

Czasopismo publikujące prace naukowe z zakresu geodezji i kartografii. Bazę tematyczną czasopisma stanowią prace geodezyjne instytutów i zakładów naukowych wyższych uczelni technicznych oraz Geodezyjnego Instytutu Naukowo-Badawczego Gł. U. P. K. Czasopismo uwzględnia wymianę myśli naukowej w zakresie zbieżnych zagadnień z geologią, geofizyką i geografią.

Cena zeszytu: zł 5. —

MYŚL FILOZOFICZNA (kwartalnik)

Czasopismo poświęcone zagadnieniom materializmu dialektycznego i historycznego, historii filozofii, postępowym tradycjom polskiej myśli filozoficzno-społecznej, filozofii przyrodoznawstwa, logice, etyce, estetyce oraz innym dziedzinom filozofii. Stoi na stanowisku konsekwentnego materializmu i stawia sobie za cel walkę z wszelkimi kierunkami reakcyjnej, idealistycznej filozofii i socjologii burżuazyjnej. Dąży do upowszechnienia filozofii marksistowsko - leninowskiej w najszerszych kołach pracowników naukowych i działaczy społecznych wszystkich dziedzin.

Cena zeszytu: zł 10. —

POSTĘPY FIZYKI (kwartalnik)

Czasopismo poświęcone upowszechnianiu wiedzy fizycznej w Polsce. Ogłasza monografie syntetyczne obejmujące najnowsze zdobycze fizyki. Zamieszcza komunikaty dla członków PTF oraz krótkie streszczenia prac badawczych przedstawionych na zjazdach fizyków polskich.

Cena zeszytu: zł 9. —

PRZEGLĄD GEOGRAFICZNY (kwartalnik)

Czasopismo jest organem Polskiego Towarzystwa Geograficznego. Publikuje artykuły naukowe, notatki, sprawozdania, aktualności geograficzne, recenzje i kronikę geograficzną.

Cena zeszytu: zł 5. —

ŻYCIE NAUKI (miesięcznik)

Czasopismo dostarczające światu naukowemu gruntownych informacji o całości prac badawczych PAN, wyższych uczelni, poszczególnych instytutów, instytucji i placówek naukowych. Poświęca wiele uwagi zagadnieniom dydaktyki i organizacji szkół wyższych, jak również życiu społeczno-organizacyjnemu pracowników nauki. Uwzględnia problemowe zagadnienia teoretyczne, wskazuje kierunkowe rozwiązania w ramach poszczególnych dyscyplin, łączy je z praktyką dydaktyczną wyższych uczelni.

Cena zeszytu: zł 5. —

Do nabycia w księgarniach DOMU KSIĄŻKI

Wysyła Instytucjom Księgarnia Naukowa DOMU KSIĄŻKI,
Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7
po wpłaceniu należności na konto PKO — Warszawa Nr I-15743/110,
osobom prywatnym — za zaliczeniem.

SPIS TREŚCI

str.

T. W. Szczepkowski i B. Skarżyński: Biochemia samożywnych bakterii siarkowych. Cz. I. Układ cytochromowy i hemoproteidy *Thiobacillus thioparus* i *Thiobacillus thiooxydans* 93

H. Jurkowska: Zdolność przystosowania się kropidlaka (*Aspergillus niger*) do miedzi 107

W. Maliszewska: Charakterystyka mikrobiologiczna gleb z doświadczeń statycznych w Gołębiewie 123

J. Kobus: Niektóre cechy morfologiczne i fizjologiczne bakterii symbiotycznych roślin motylkowych 138

J. Supińska - Jakubowska: Wytwarzanie acetoiny przez *Streptococcus diacetilactis* 151

СОДЕРЖАНИЕ

стр.

Т. В. Щепковски и Б. Скаржински: Биохимия автотрофных серобактерий. Часть I. Цитохромная система и гемопротеидные энзимы у *Th. thioparus* и *Th. thiooxydans*. . . 93

Г. Юрковска: Способность адаптации к меди *Aspergillus niger* 107

В. Малишевска: Микробиологическая характеристика почв на основании статических опытов в Голембеве 123

И. Кобус: Некоторые морфологические и физиологические признаки *Rhizobium* 138

Я. Супинска-Якубовска: Образование ацетоина стрептококком *diacetilactis* 151

CONTENTS

page

T. W. Szczepkowski i B. Skarżyński: The biochemistry of autotrophic bacteria. Part. I. The cytochromes and hemoprotein enzymes in *Thiobacillus thioparus* and *Thiobacillus thiooxydans* 93

H. Jurkowska: The adaptation of *Aspergillus niger* to copper 107

W. Maliszewska: The microbial characteristics of the soils from statical experiments in Agr. Exp. Station Gołębiew . 123

J. Kobus: Some morphological and physiological properties of *Rhizobium* 138

J. Supińska-Jakubowska: Production of acetoin by *Str. diacetilactis* 151

kiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz nr rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem nr rysunku i wykresu. W objaśnieniach należy podawać powiększenie. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia) oraz dołączyć wykaz tablic i rysunków z podaniem numeracji i miejsca w tekście.

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podawać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Cienkowski (18..) lub (Cienkowski, 18..). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora (-ów) — dwukropek — tytuł pracy, nazwę czasopisma w przyjętych skrótach, rok, tom, ewentualnie zeszyt, stronicę czasopisma; w wypadku zaś cytowania książki: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora (-ów), tytuł książki, wydanie, miejsce i rok wydania, firmę wydawcy, ewentualnie stronicę tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml a nie cm, g — nie gr, 100° — a nie 100° C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżniać „%“ — g na 100 g roztworu, „% objętościowy“ — ml na 100 ml roztworu, „stężenie %“ — g na 100 ml roztworu.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może się zwrócić do redakcji przy składaniu maszynopisu.